Ministerio de CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ENTRE TODOS | GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA | VAMOS MÁS ALTO

VI Congreso Internacional CIENCIA Y TECNOLOGÍA de los ALIMENTOS 2016
CÓRDOBA - ARGENTINA
— Año Internacional de las Legumbres —

ANÁLISIS FISICO-QUÍMICOS Y SENSORIALES

Análisis físico-químico y sensoriales de los alimentos : trabajos completos : VI Congreso
Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016 / María Verónica Baroni ... [et
al.] ; compilado por Alberto Edel León ; editado por Victoria Rosati ; Carlos W. Robledo ;
Alberto Edel León. - 1a ed compendiada. - Córdoba : Ministerio de Ciencia y Tecnología
de la provincia de Córdoba, 2017.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-45380-5-5

1. Tecnologia de los Alimentos. 2. Análisis de los Alimentos. I. Baroni, María Verónica II. León, Alberto Edel , comp. III. Rosati, Victoria , ed. IV. Robledo, Carlos W., ed. V. León, Alberto Edel , ed.
CDD 664

ISBN 978-987-45380-5-5
9 789874 538055

PRÓLOGO

El análisis químico de los alimentos es una temática de gran interés y utilidad durante los procesos de control de calidad en la industria y en la investigación científica para la evaluación del valor nutricional de los alimentos y el desarrollo de nuevos productos.
En este sentido, es necesario realizar los análisis físico químicos y sensoriales a los alimentos para asegurar que sean aptos para el consumo y asegurar que cumplen con las características químicas y de composición que se espera de ellos. De acuerdo a estos obejtivos será necesario estudiar toda la cadena alimentaria desde la producción primaria, su procesamiento, conservación, preparación y puesta del producto final.
Todos los alimentos están constituídos por diferentes porporciones de agua, hidratos de carbono, proteínas, lípidos, enzimas, minerales, vitaminas, pigmentos, sabores, aromas y diversos agentes bioactivos. Las interacciones físicas y químicas que ocurren entre ellas y el medio ambiente que los rodean, determinan los parámetros de calidad que más se buscan en los alimentos, color, sabor, textura, valor nutritivo y seguridad o inocuidad.
A partir de la última edición del CICYTAC se han generado muchos avances en el análisis de alimentos y consideramos que estos 53 trabajos completos presentados y seleccionados para su publicación representan en gran medida los avances realizados y consideramos que serán de sumo interés para la población científica.

EDITORES

Baroni, María Verónica
Calandri, Edgardo
Di Paola Naranjo, Romina
Martinez, Marcela
Moiraghi, Malena

Leches enriquecidas con calcio: cambios en las características fisicoquímicas que afectan su estabilidad.

Acosta N.B.[1,2], Sihufe G.A.[2], Marino F.[2], Olivares M.L.[2]

(1) Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina
(2) Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina
nadiabelenacosta@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios en las características fisicoquímicas que afectan la estabilidad de leches enriquecidas con cloruro de calcio. Se prepararon dispersiones de leche en polvo descremada a las cuales se les adicionó cloruro de calcio para alcanzar concentraciones de 0, 5, 30, 50 y 100 mmol/kg. Luego, las leches fueron centrifugadas a 50.000 g durante dos horas a 25°C para obtener en el sobrenadante el suero libre de micelas de caseína (MC). La concentración de proteína en leche fue de 32,9 g/l. Las muestras con 30, 50 y 100 mmol/kg presentaron concentraciones de proteína en suero significativamente menores a las de 0 y 5 mmol/kg de calcio agregado. Asimismo, la muestra con 5 mmol/kg de calcio agregado presentó menor concentración de proteína en suero que la muestra sin agregado de calcio. Estos resultados coinciden con los de PAGE-SDS donde se observó que a medida que aumenta la concentración de calcio agregado disminuye la cantidad de α_{s1}-, β- y κ-caseínas, siendo escasamente detectadas en las muestras con 30, 50 y 100 mmol/kg. Estos resultados sugieren que, al adicionar calcio, las caseínas presentes en el suero se incorporan a las MC pre-existentes o constituyen nuevas estructuras micelares a los efectos de secuestrar el calcio adicionado. Con respecto al calcio en suero, no se observaron diferencias significativas entre las muestras con 0 y 5 mmol/kg, mientras que el resto de las muestras presentaron valores significativamente mayores. Se podría inferir que parte del calcio adicionado logra incorporarse a la estructura micelar. Se concluye que el enriquecimiento con cloruro de calcio altera el equilibrio iónico natural de la leche y su estructura proteica afectando la estabilidad de este complejo sistema coloidal.

Palabras Clave: leches enriquecidas, calcio, estabilidad

ABSTRACT

The objective of the present work was to study the changes of the physicochemical characteristics that affect the stability of milks enriched with calcium chloride. Skim milk powders dispersions with addition of calcium chloride to reach concentrations of 0, 5, 30, 50 and 100 mmol/kg were prepared. Then, milks were ultracentrifugated and the corresponding serum phases free of casein micelles (MC) were obtained. Milk protein concentration was 32.9 g/l. The samples with 30, 50 and 100 mmol/kg presented serum protein concentrations significantly lower than the samples with 0 and 5 mmol/kg o added calcium. In addition, the sample with 5 mmol/kg of added calcium presented lower serum protein concentration than the sample without added calcium. These results agree with those of PAGE-SDS where was observed that as the calcium concentration increases the amounts of α_{s1}-, β- y κ-caseins decrease, being poorly detected in the samples with 30, 50 and 100 mmol/kg. These results suggest that when calcium is added caseins would either became part existing micelles or constitute new caseins structures in order to sequestrate the added calcium. With regard to the calcium in serum phase, significant differences were not observed between samples with 0 and 5 mmol/kg, while the other samples presented values significantly higher. It might infer that part of the added calcium is incorporated to the micellar structure. It is concluded that the enrichment with calcium chloride alters the natural ionic equilibrium of milk and its protein structure affecting the stability of this complex colloidal system.

Keywords: enriched milks, calcium, stability.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es un sistema en el cual se pueden diferenciar tres tipos de partículas de tamaño coloidal: los glóbulos de grasa compuestos principalmente por triacilgliceroles (≈ 1 µm; 4% p/v); las MC (≈ 0,1µm; 2,8 % p/v); y las proteínas del suero (≈ 0,01 µm; 1% p/v). El resto de los componentes de tamaño más pequeño (más de 100.000 especies en la leche) pueden ser considerados como parte de la fase continua (Horne 2003). Una micela bovina típica contiene cuatro tipos diferentes de caseínas: α_{s1}-, α_{s2}-, β- y κ-caseína agregadas con fosfato de calcio y pequeñas cantidades de citrato (Horne 2003). A pesar de que la estructura interna de las MC es todavía un tema controversial, existe consenso en considerar que la mayoría de las κ-caseínas se encuentra presente sobre la superficie de las micelas y forman una capa o "cepillo" extendiendo su porción C-terminal hacia el suero. Esta organización genera la conocida estabilización estérica (Dalgleish y Corredig 2012).

En la leche, el calcio se encuentra en equilibrio entre la fase micelar (o coloidal) y la fase continua (o suero). En el suero, está principalmente en forma libre o asociado con citrato y en menor medida, con fosfato inorgánico, cloruro y α-lactoalbúmina. En la fase micelar, el calcio se presenta como fosfato de calcio coloidal (CCP-*colloidal calcium phosphate*) unido a las MC. La mayoría del calcio (70%) se localiza en esta fase (Koutina et al. 2015). Este equilibrio depende de las condiciones fisicoquímicas como temperatura, pH, presencia de diferentes minerales, etc. El CCP incluye dos formas principales de asociación de minerales. Estos son la unión de cationes a residuos ácidos de las moléculas de caseína (ácido glutámico y aspártico) y los nanoclusters de fosfato de calcio. Estos últimos son estructuras amorfas de aproximadamente 2,5 nm rodeadas por los residuos fosfoserilo de las α_{s1}-, α_{s2}- y β-caseínas. El CCP se encuentra en equilibrio dinámico con fosfato de calcio presente en el suero. Este equilibrio depende de las condiciones fisicoquímicas como temperatura, pH, presencia de diferentes minerales y fuerza iónica (Nogueira Silva et al. 2015).

El incremento de calcio en productos lácteos se puede realizar mediante el agregado de sales. Esta modificación tecnológica produce alteración del balance mineral natural de la leche, la modificación de su estructura coloidal y la pérdida de estabilidad. Esto podría causar inconvenientes en las distintas etapas del procesamiento de la leche y podría estar asociado al problema de gelificación en las leches evaporadas o al aumento de viscosidad (conocido como "*age-thickening*") que suele ocurrir durante el almacenamiento (Bienvenue et al. 2003). El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en las características fisicoquímicas que afectan la estabilidad de leches enriquecidas con cloruro de calcio.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de las muestras

Para la preparación de las dispersiones se usó leche en polvo descremada con bajo tratamiento térmico (SanCor Cooperativas Unidas Ltda., Sunchales, Argentina). Se prepararon por duplicado 500g de dispersiones de leche en polvo descremada con una concentración de 10% p/p siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para esto se pesó la cantidad necesaria de agua ultrapura y la masa correspondiente de leche en polvo descremada se dispersó bajo agitación constante a 25ºC. Una vez finalizada la dispersión, ésta se mantuvo a 25°C bajo agitación durante cuatro horas. Unos minutos antes de finalizar el tiempo establecido, se agregó azida sódica en una concentración final de 0,02% (p/p) para prevenir la degradación microbiana. Las dispersiones así formuladas se mantuvieron a 25ºC durante toda la noche. Luego, se fraccionaron en alícuotas de 100 g y se adicionó la cantidad necesaria de cloruro de calcio para alcanzar concentraciones de 0, 5, 30, 50 y 100 mmol/kg, agitando en cada caso durante 10 minutos. Finalizado este procedimiento las muestras se mantuvieron a 25ºC durante toda la noche para garantizar que se alcance el equilibrio iónico. Al siguiente día se centrifugaron alícuotas de las leches a 50.000 g durante dos horas a 25°C para obtener en el sobrenadante el suero libre de MC.

Método de análisis

La concentración proteica en leche y en suero se determinó por el método de Bradford, el cual se basa en la medición a 595 nm de la cantidad de colorante Coomassie Blue G-250, en su forma aniónica (azúl), unido a las proteínas (Manzo 2013).
La concentración de calcio en leche y en suero se determinó mediante absorción atómica por llama de oxi-acetileno (USEPA 1991). La concentración de calcio micelar se determinó por diferencia entre las concentraciones de calcio en leche y en suero.
Se analizó la naturaleza proteica del suero mediante la técnica PAGE-SDS discontinuo, donde se utilizaron dos geles de poliacrilamida de resolución y apilamiento con diferentes concentraciones de acrilamida, composición y pH. El gel de apilamiento (8% p/v de acrilamida; pH 6,8) se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositarán las muestras. El gel de resolución (12% p/v de acrilamida; pH 8,8), constituye el gel por donde migrarán y se separarán las proteínas generando un perfil de banda electroforético. Dicho perfil varía de acuerdo al peso molecular (PM) de cada una de las proteínas (Walker 2002). Antes de ser utilizados en la corrida, los permeados de suero se calentaron a 100°C durante 3 minutos en buffer de muestra con dodecil sulfato de sodio (SDS), β-mercaptoetanol y azul de bromofenol. El β-mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro que confieren la estructura terciaria a las proteínas, mientras que el SDS es un detergente aniónico que se une a las proteínas confiriéndoles carga neta constante negativa. De esta manera, la separación proteica se realiza por diferencia de PM.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico del efecto del agregado de cloruro de calcio sobre los parámetros analizados (concentración de proteína y concentración de calcio) mediante análisis de varianza utilizando el programa Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$), se realizó una comparación múltiple de medias mediante el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todas las muestras de leche reconstituida con y sin agregado de cloruro de calcio presentaron estabilidad macroscópica durante el tiempo en el que fueron evaluadas y durante una semana posterior refrigeradas en heladera a 8°C. No se observó la presencia de agregados ni de fenómenos de precipitación. No obstante, para tener información más precisa sobre la estabilidad coloidal de las leches, se espera profundizar este análisis con estudios de microscopía confocal, determinación de tamaño de partícula y potencial zeta y análisis reológico. Asimismo, resulta relevante analizar su estabilidad térmica y en procesos comúnmente usados durante el procesamiento de la leche como la concentración por evaporación.

La concentración de proteína en leche fue de 32,9 g/l. Este resultado coincide con el reportado por el fabricante en el rótulo del envase y es similar al valor reportado por otros autores (Walstra 2006, Koutina et al. 2015). De esta forma, se concluye que el método de Bradaford para cuantificar proteínas es adecuado para este tipo de material. En la **Tabla 1** se presentan los valores de concentración de proteína en suero. Estos valores resultaron inferiores a los esperados debido al tratamiento térmico durante la producción de la leche en polvo, que provoca desnaturalización parcial de las proteínas del suero y adherencia a la superficie de las MC. No obstante, los valores obtenidos coinciden con los reportados por Koutina et al. (2015). Las muestras con 30, 50 y 100 mmol/kg de cloruro de calcio agregado presentaron concentraciones de proteína en suero significativamente menores a las de 0 y 5 mmol/kg. Asimismo, la muestra con 5 mmol/kg de cloruro de calcio agregado presentó menor concentración de proteína en suero que la muestra sin agregado de calcio. Para un mejor entendimiento de la naturaleza proteica del suero éstos se analizaron por PAGE-SDS. En ausencia de iones adicionados, las suspensiones de MC contienen una pequeña cantidad de moléculas de caseínas en la fase acuosa. Esta cantidad es del orden del 5% con respecto al total de las caseínas. En forma concordante a lo observado mediante la técnica de cuantificación de Bradford, se observó que a medida que aumenta la concentración de calcio agregado disminuye la intensidad de las bandas correspondientes a la α_{s1}-, β- y κ-caseínas, siendo escasamente detectadas en las muestras con 30, 50 y 100 mmol/kg (**Figura 1**). Estos resultados sugieren que al adicionar calcio, las caseínas presentes en el suero se incorporan a MC pre-

existentes o constituyen nuevas estructuras micelares a los efectos de secuestrar el calcio adicionado. Estos resultados concuerdan con otros previamente reportados (Famelart, et al. 1999, Philippe et al. 2003, Philippe et al. 2005). Asimismo, en forma cualitativa se observa una disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la β-lactoglobulina a medida que aumenta la concentración de cloruro de calcio agregado (**Figura 1**). No obstante, se espera profundizar este análisis con nuevas experiencias y con la cuantificación de cada una de las fracciones proteicas observadas en los geles. Estas observaciones son similares a las reportadas por Koutina et al. (2015) quienes sugieren que cuando se adiciona calcio las β-lactoglobulinas forman complejos con las κ-caseínas en la fase micelar.

En la **Tabla 1** también se presentan los valores obtenidos de concentración de calcio en leche, suero y micelar. El único parámetro que no presentó diferencias significativas debido al agregado de cloruro de calcio fue el calcio micelar. Se obtuvo un valor de concentración de calcio en leche sin agregado de calcio similar a lo reportado para este alimento (Walstra et al. 2006). De esta forma, se concluye que el método de absorción atómica para cuantificar la concentración de calcio iónico es adecuado para este tipo de material. Con respecto a la concentración de calcio en suero, no se observaron diferencias significativas entre las muestras con 0 y 5 mmol/kg de cloruro de calcio agregado, mientras que el resto de las muestras presentaron valores significativamente mayores. Se podría inferir que parte del calcio adicionado logra incorporarse a la estructura micelar.

Tabla 1. Contenido proteico en suero y concentración de calcio en leche, suero y micelar de leches enriquecidas con cloruro de calcio.

$CaCl_2$ adicionado (mmol/kg)	**Proteína en suero (g/l)**	**Calcio total (mg/g)**	**Calcio en suero (mg/g)**	**Calcio micelar (mg/g)**
0	3,05[c]	1,75[a]	0,67[a]	1,08
5	2,75[b]	2,26[a]	0,86[a]	1,40
30	2,07[a]	3,80[b]	1,87[b]	1,93
50	1,98[a]	5,08[c]	3,14[c]	1,94
100	2.11[a]	10,46[d]	7,73[d]	2,73

a-d: los promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p<0,05$).

Estos resultados coinciden con otros previamente reportados que sugieren que el enriquecimiento de leche con sales de calcio influencia el nivel de CCP, la proporción de caseínas en las fases coloidal y continua, la actividad de Ca^{2+} y la fuerza iónica de la leche. Asimismo, estos estudios muestran que se produce una disminución de la hidratación de las MC y del potencial zeta. (Famelart et al. 1999, Philippe et al. 2005, Koutina et al. 2015). La adición de este mineral neutraliza los residuos cargados negativamente en la superficie de las micelas, haciendo que éstas se tornen más susceptibles a la agregación. Consecuentemente, las propiedades estabilizadoras de la capa de κ-caseína que rodea a las MC están estrechamente asociadas con la concentración de calcio (Ye y Harte 2013).

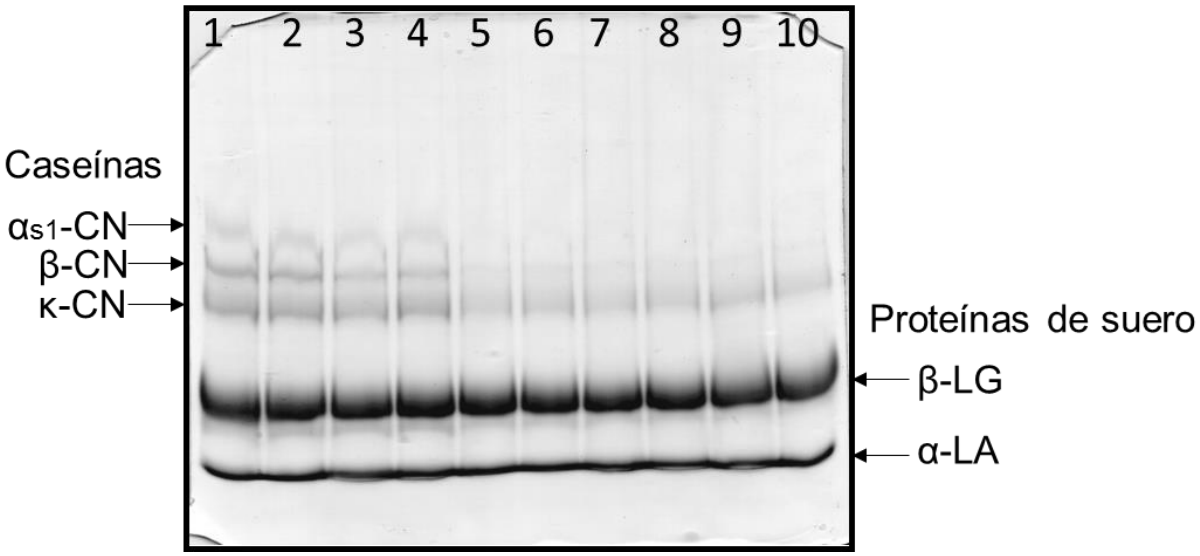


Figura 1. Electroforetograma correspondiente a permeados de leche: Carriles 1 y 2 sin agregado de cloruro de calcio, 3 y 4 con agregado de 5 mmol/kg, 5 y 6 con agregado de 30 mmol/kg, 7 y 8 con agregado de 50 mmol/kg, 9 y 10 con agregado de 100 mmol/kg.

CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron los cambios en las características fisicoquímicas que afectan la estabilidad de leches enriquecidas con cloruro de calcio. Se estudiaron muestras de leche reconstituida con concentraciones de 0, 5, 30, 50 y 100 mmol/kg de cloruro de calcio adicionado. Se concluye que el enriquecimiento con cloruro de calcio altera el equilibrio iónico natural de la leche y su estructura proteica afectando la estabilidad de este complejo sistema coloidal. No obstante, una adición de hasta 5 mmol/kg de cloruro de calcio sería factible como modificación tecnológica de la leche, debido a que no se afecta en forma significativa el balance mineral y, consecuentemente, su estabilidad coloidal.

BIBLIOGRAFÍA

Bienvenue A, Jiménez-Flores R, Singh H. 2003. Rheological properties of concentrated skim milk: importance of soluble minerals in the changes in viscosity during storage. Journal of Dairy Science, 86: 3813-3821.

Dalgleish DG, Corredig M. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. Annual Review of Food Science and Technology, 3: 449–467.

Horne DS. 2003. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. Colloid Surfaces A., 213: 255-263.

Famelart MH, Le Graët Y, Raulot K. 1999. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl2: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. Intenational Dairy Journal, 9: 293-297.

Koutina G, Knudsen JC, Skibsted LH. 2015. The effect of pH on calcium and phosphorus distribution between micellar and serum phase after enrichment of skim milk with calcium D-lactobionate. Dairy Sci. and Technol., 95: 63-74.

Manzo RM. 2013. Preparación y caracterización de derivados insolubilizados de la enzima L-Arabinosa isomerasa para su empleo en la bioconversión de D-Galactosa en D-Tagatosa. (Tesis de Doctorado). Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

Nogueira Silva N, Bahri A, Guyomarc´h F, Beaucher E, Gaucheron F. 2015. AFM study of casein micelles cross-linked by genipin: effects of acid pH and citrate. Dairy Science & Technology, 95: 75-86.

Philippe M, Gaucheron F, Le Graët Y, Michel F, Garem A. 2003. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. Lait, 83: 45-59.

Philippe M, Le Graët Y, Gaucheron F. 2005. The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. Food Chemistry, 90: 673-683.

USEPA 1991 – Method 200.3: Sample Preparation Procedure For Spectrochemical Determination of Total Recoverable Element in Biological Tissues. Enviromental Protection Agency Revision 1.0 EPA – 600/4 – 91 – 010.

Walker JM. 2002. SDS Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. En: Walker JM, editores. The Protein Protocols Handbook, 2ª ed. Nueva Jersey: Humana Press. pag 69.

Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. 2006. Dairy Science & Technology, 2ª ed. Boca Raton: CRC Press. pag 26.

Ye R, Harte F. 2013. Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl2 on the particle size of reconstituted casein micelles. Journal of Dairy Science, 96: 799-805.

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.

Propiedades fisicoquímicas e isotermas de desorción de harina de topinambur precocido

Alaniz G.[1], Baroja M.[2], Possetto M.[1,2], Grzona M.[1,3], Ponzi M.[1,3], Comelli N.[1,3]

(1) Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias (UNSL), Autopista N° 55 Extremo Norte, Villa Mercedes, San Luis, Argentina.
(2) Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Autopista N° 55 Extremo Norte, Villa Mercedes, San Luis, Argentina.
(3) INTEQUI CONICET, Autopista N° 55 Extremo Norte, Villa Mercedes, San Luis, Argentina.
gaby.i.alaniz@gmail.com

RESUMEN

La harina obtenida de tubérculos de topinambur contiene prebióticos que promueven el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo humano. Este trabajo tiene como objetivo estudiar las características fisicoquímicas y determinar las isotermas de desorción de agua de harina de topinambur precocido, como así también realizar el modelado de los datos experimentales utilizando diferentes ecuaciones propuestas en la literatura. Se obtuvieron isotermas de desorción a dos temperaturas (25 y 30°C) para el rango de a_w entre 0,346 y 0,86. Los datos experimentales se ajustaron utilizando los modelos de GAB, Oswin y Halsey. La calidad del ajuste se evaluó con el coeficiente de regresión (R^2) y el porcentaje de error relativo medio (% E). Se obtuvo un rango de R^2 entre 0,85 y 0,99, siendo el modelo propuesto por GAB el que presentó menor error porcentual. Se determinó la composición química proximal empleando métodos estándar de análisis (AOAC, 2000). Los resultados mostraron un contenido de humedad de 13,46 g/100g, cenizas 6,53 g/100g, proteínas 9,20 g/100g, grasas 0,29 g/100g y un contenido de fibra bruta de 6,58 g/100g. La harina también se caracterizó mediante técnicas de difracción de rayos X (DRX), análisis térmico (TGA) y espectroscopía de infrarrojo (FTIR).

Palabras Clave: topinambur, inulina, composición química, isotermas de desorción.

ABSTRACT

The flour obtained from Jerusalem artichoke tubers contains prebiotics that promote beneficial bacteria growth in the human digestive tract. This work aims to study the physicochemical characteristics and determine the water desorption isotherms topinambur precooked flour as well as perform modeling of experimental data using different equations proposed in the literature. Desorption isotherms at two temperatures (25 and 30 °C) for a_w range between 0,346 and 0,86 were constructed. The experimental data were fitted using mathematical models of GAB, Oswin and Halsey. The quality of fit was assessed with regression coefficient (R^2) and the mean relative error percentage (% E). R^2 range between 0,85 and 0,99 was obtained, proposed by GAB which showed a lower percentage error model. The proximal chemical composition was determined using standard analytical methods (AOAC, 2000). The results showed a moisture content of 13,46 g / 100 g, ash 6,53 g / 100g, protein 9,20 g / 100g, fat 0,29 g / 100g and crude fiber content of 6,58 g / 100g. The flour was also characterized by infrared (FTIR) spectroscopy, thermal analysis (TGA) and X-ray diffraction (XRD) techniques.

Keywords: Jerusalem artichoke, inulin, chemical composition desorption isotherms.

INTRODUCCIÓN

Se considera alimento funcional al que, además de sus valores nutritivos intrínsecos, demuestra tener efectos beneficiosos sobre una o más funciones selectivas del organismo, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas (Madrigal y Sangronis

2007).
La investigación médica indica que la "dieta occidental", alta en grasas (especialmente saturadas) y alimentos con alta densidad energética y además baja en fibra dietética y carbohidratos no refinados, es perjudicial para la salud. Los cambios alimentarios no sólo influyen en la salud presente sino que pueden determinar que un individuo a lo largo de su vida padezca o no enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes en etapas posteriores. Por todo esto, la tendencia de comer para el bienestar en lugar de comer para la enfermedad, será una de las principales consignas de la industria mundial de alimentos en los próximos 20 años (Palou y Serra 2000).
El topinambur (*Helianthus tuberosus L.*) es un tubérculo con alto contenido de inulina, que se presenta como una alternativa de interés para los estudios orientados a ofrecer alimentos con propiedades saludables (Scollo et al. 2011). El topinambur tiene un aporte energético reducido de 1,5 Kcal/g, y efecto hipoglucemiante, alto contenido en minerales, especialmente la relación potasio - sodio lo presenta como un alimento adecuado para patologías que presenten hipertensión (Roberfroid 1999).
La inulina es el componente de mayor interés en este tubérculo, el topinambur presenta en su composición química, un valor promedio de 76% de inulina en base a 100 g de materia seca. La inulina está constituida por moléculas de fructosa unidas por enlaces β (2→1) fructosil-fructosa, siendo el término "fructanos" el utilizado para denominar este tipo de compuestos. Las cadenas de fructosa tienen la particularidad de terminar en una unidad de glucosa unida por un enlace "α (1,2)". Dentro del grupo de los fructanos, la inulina tiene un grado de polimerización que varía entre 2 y 60 unidades. Todos ellos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de los animales, por lo que permanecen intactos hasta el colon donde son hidrolizados y fermentados por las bacterias presentes en el intestino (Scollo et al. 2011).
El consumo de 4 g de inulina diarios es efectivo para aumentar el número de bacterias benéficas en el colon (Rao 1999). Entre los efectos positivos para la salud de la inulina obtenida a partir de topinambur se destacan la función de fibra dietética y la capacidad para actuar como prebiótico y como reemplazo de grasas y azúcares (Choque Delgado et al. 2011). Además, la harina producida a partir de este tubérculo no forma gluten, lo que la hace apta para celíacos.
El uso de inulina también ha sido investigado por Yang et al. (2015), quienes establecieron que la inulina como prebiótico simula el crecimiento de cepas existentes de bacterias beneficiosas en el colon, mejora la absorción de componentes minerales importantes como el calcio y el magnesio, así como también la síntesis de vitaminas del grupo B. Observaron además que la inulina desempeña un papel importante en la prevención e inhibición del cáncer colorrectal, de colon y mama.
Rubel et al. (2015) determinaron que el pan de trigo puede ser enriquecido con polvo de inulina extraída de tubérculos de topinambur, pudiéndose añadir hasta 2,5 g de polvo de inulina por 100 g de harina sin consecuencias perjudiciales sobre las propiedades viscoelásticas de la masa y las propiedades físicas del pan, manteniendo la calidad de los atributos del pan convencional.
Por otro lado, el estudio realizado por Radovanovic et al. (2015) reveló que el uso de harina de trigo sarraceno y la incorporación de harina obtenida a partir de tubérculos de topinambur en el desarrollo de productos alimenticios extruídos de bajo índice glucémico tales como cereales para el desayuno y aperitivos listos para el consumo, permitió obtener alimentos con un mayor nivel de fibra dietética total y de inulina, como así también un menor nivel de hidratos de carbono, lípidos y proteínas comparados con los valores obtenidos cuando se utilizó únicamente harina de trigo sarraceno en el desarrollo de esos productos.
Los objetivos del presente trabajo fueron realizar la caracterización fisicoquímica de harina de topinambur precocido y determinar las isotermas de desorción de agua para establecer las mejores condiciones de almacenamiento de la harina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima y elaboración de harina

La harina de topinambur se elaboró a partir de tubérculos frescos cosechados de parcelas experimentales de

la Estación Experimental Agropecuaria INTA San Luis, situada en la ciudad de Villa Mercedes. Los tubérculos se almacenaron en cámara frigorífica a 4±1ºC hasta su utilización. En primer lugar, se realizó una selección manual de manera de no utilizar aquellos que no cumplen con las características físicas y microbiológicas adecuadas. Luego se efectuó un lavado por inmersión en agua potable seguido de la precocción, ésta última operación se llevó a cabo con agua hirviendo, sin el agregado de ningún aditivo, durante tres minutos. Los tubérculos pelados se procesaron hasta obtener un puré.

La deshidratación del material húmedo se llevó a cabo en un horno solar mixto a una temperatura de 60°C y una velocidad de aire de aproximadamente 0,9 cm/s. El tiempo promedio de secado para láminas de puré de topinambur de 3 mm de espesor fue de 26 horas. Finalizado el proceso de secado, el material se molió en un molino de cuchillas hasta granulometría deseada. La harina obtenida, un polvo de color marrón claro, se envasó en bolsas de polietileno cerradas.

Caracterización química

El análisis de la composición química de la harina de topinambur precocido se realizó siguiendo la metodología descripta por los métodos estándar de análisis (AOAC, 2000). La determinación de proteínas se realizó por el método de Kjeldahl con un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25. Las grasas se determinaron por el método de Mojonnier. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Isotermas de desorción

Para la construcción de las isotermas de desorción se partió de harina de topinambur de actividad acuosa a_w 0,54 a 24,9°C. Luego de su humectación, se la distribuyó en 15 cápsulas previamente taradas y se las colocó en estufa a 70°C. Se tomaron muestras con intervalos de tiempo de 15 minutos, las cuales fueron enfriadas en un desecador de vidrio y pesadas. La actividad de agua se midió en un equipo Aqualab Series 3TE. El procedimiento se repitió a 25 y 30°C. Los datos experimentales se modelaron con las ecuaciones de GAB, Oswin y Halsey, las que se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ecuaciones para el modelado de las isotermas de harina de topinambur precocido.

Modelo	Ecuación		Parámetros
GAB	$X = \frac{X_m C K a_w}{(1 - K a_w)(1 + (C - 1) K a_w)}$	(1)	X: contenido de humedad. X_m: contenido de humedad de monocapa. C: constante de Guggenheim, característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa. K: factor de corrección relacionado con el calor de desorción de la multicapa. a_w: actividad de agua.
OSWIN	$X = a\left(\frac{a_w}{(1 - a_w)}\right)^b$	(2)	X: contenido de humedad. a y b: constantes del modelo y características para cada alimento. a_w: actividad de agua.
HALSEY	$X = \left(\frac{-a}{\ln(a_w)}\right)^{1/b}$	(3)	

La estimación de parámetros de cada modelo se llevó a cabo mediante una rutina en lenguaje MATLAB. La calidad del ajuste se evalúo por medio del coeficiente de correlación lineal (R^2), el que debe ser superior a 0,85 para conseguir un buen modelado de los datos experimentales y por el porcentaje de error medio relativo (%E) Ec. (4).

$$\%E = \frac{100}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{|X_{ei} - X_{ci}|}{X_{ei}} \quad (4)$$

Donde X_{ei}: contenido de humedad experimental (g agua/g sólido seco); X_{ci}: contenido de humedad calculada a partir de cada modelo (g agua/g sólido seco); n: número de observaciones.

Difracción de rayos X

El patrón de difracción de rayos X de la harina de topinambur precocido fue obtenido utilizando un difractómetro marca Rigaku modelo DMax 111 C equipado con filtro de Ni y radiación Cu K_α (λ = 1,54056 Å) a un potencial de 40 kV y 200 mA. La radiación dispersada se detectó en un rango de 5 a 90°.

Espectroscopía infrarroja

Se mezcló harina de topinambur precocido con KrBr y se registró el espectro de infrarrojo en un espectrómetro marca Perkin Elmer modelo Spectrum RXT en un rango de 4000 a 400 cm^{-1}.

Análisis termogravimétrico

La descomposición térmica de la harina fue estudiada mediante la técnica de análisis termogravimétrico usando una termobalanza marca Shimadzu modelo DTG 60WS. Durante el análisis la muestra se calentó hasta 800°C con una velocidad de calentamiento de 15°C/ min en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 20 cm^3/ min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química proximal

En la **Tabla 2** se presentan los resultados de la caracterización química de la harina de topinambur precocido.

Tabla 2. Composición química de harina de topinambur precocido

Composición química	(%)
Humedad	13,46
Cenizas	6,53
Proteínas	9,20
Fibra bruta	6,58
Grasa	0,29
Carbohidratos totales (*)	63,94

(*): Calculado por diferencia

Nota: Los resultados de los análisis están expresados en base a 100 g de material seco.

Entre los componentes de la harina de topinambur se destacan los carbohidratos, cuyo compuesto mayoritario es la inulina, que alcanza concentraciones entre el 49,5 y 56,4% de la materia seca del tubérculo. Los carbohidratos solubles presentes junto a la inulina son sus fructooligosacáridos derivados de azúcares como fructosa, glucosa y sacarosa. Tal como se describe posteriormente, los estudios de DRX no mostraron presencia de almidones. Por otro lado, a partir de los datos se observa un importante contenido de proteínas comparado con otras harinas libres de gluten (Kaushal et al. 2012).

Los resultados experimentales demuestran que la harina en estudio contiene un alto valor de fibra bruta y un contenido de cenizas comparable al de harina de papa. En cuanto al contenido de grasas, en la **Tabla 2** se muestra que es bajo, esto último genera una característica positiva del producto ya que los valores bajos de grasa inciden en la no rancidez de la harina una vez envasada.

Contenido de humedad de equilibrio

La humedad inicial de la muestra de harina de topinambur precocido fue de 0,133 ± 0,001 g agua/g sólido seco. La **Figura 1** muestra los datos de humedad experimental obtenida en el equilibrio, en función de la actividad de agua para dos temperaturas de trabajo (25 y 30°C). Se puede observar que se obtuvieron isotermas de tipo II, de forma sigmoidea o tipo S, de acuerdo a la clasificación IUPAC. Este tipo de isotermas se ha encontrado en diferentes alimentos y son características de productos solubles. Muestran una tendencia asintótica a medida que la actividad de agua se acerca a la unidad y además presentan un punto de inflexión a valores bajos de a_w.

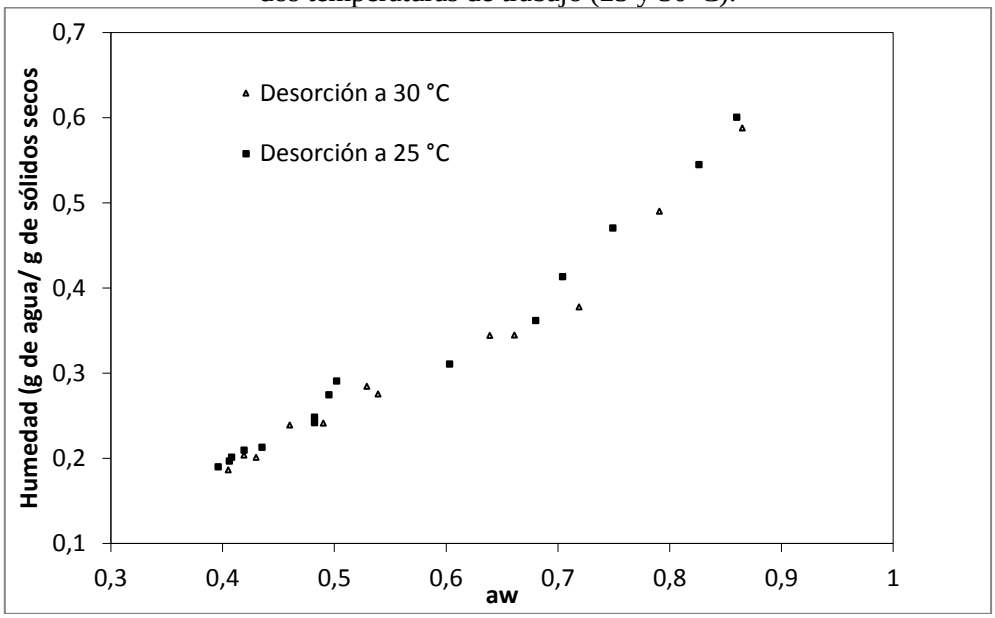
Las isotermas sigmoides pueden dividirse generalmente en tres regiones, la región 1 que corresponde a a_w< 0,33 que se refiere a la adsorción de agua en la capa monomolecular (X_m), la región 2 para a_w entre 0,33 y 0,73, correspondiente a la adsorción de agua en capas adicionales a X_m y la tercera región para a_w entre 0,73 y 1, correspondiente a la condensación de agua en los poros del material.

En la **Figura 1** se observa que la humedad aumenta con el incremento de actividad acuosa, siendo más rápido este aumento para valores superiores a 0,42. Este comportamiento es prácticamente común en todos los alimentos.

Se evidencia una dependencia con la temperatura, la cantidad de agua adsorbida fue menor a mayor temperatura, indicando que la sorción de agua sobre la harina de topinambur precocido es exotérmica. Por lo

tanto a humedad constante, se observa un aumento de a_w con la temperatura. Mohamed et al. (2005), han explicado este comportamiento argumentando que un incremento en la temperatura ocasiona cambios químicos y físicos en el producto, que pueden reducir el número de sitios activos donde se unen las moléculas de agua con la superficie sólida del alimento. Mazza (1980) ha manifestado que al aumentar la temperatura de sorción se incrementa el estado de excitación de las moléculas de agua, ocasionando que se aumenten las distancias entre las moléculas de agua y por consiguiente exista una disminución en las fuerzas de atracción entre ellas.

Figura 1. Contenido de humedad de equilibrio experimental de la harina de topinambur precocido para las dos temperaturas de trabajo (25 y 30°C).



Modelado de las isotermas

En la **Tabla 3** se presenta un resumen de los resultados obtenidos para los modelos propuestos, con sus respectivos parámetros, además de los valores de R^2 y del %E. En general, las tres ecuaciones propuestas mostraron un buen ajuste de los datos experimentales, dando coeficientes de correlación R^2 superiores a 0,87 y un %E en promedio para las dos temperaturas inferior al 10% con todos los modelos. El modelo de GAB presento un %E menor que los modelos propuestos por Oswin y Halsey. Como se muestra en la **Tabla 3**, los valores obtenidos para la humedad de la monocapa (X_m) de la ecuación de GAB disminuyen a medida que aumenta la temperatura.

El modelo de GAB tiene la ventaja de suministrar información valiosa sobre el contenido de humedad en la capa monomolecular (X_m) siendo este parámetro fundamental para definir las condiciones de almacenamiento.

Tabla 3. Resumen de las constantes y estadísticos obtenidos de cada modelo propuesto para la isoterma de desorción a las dos temperaturas utilizadas.

Modelo		25°C	30°C
GAB	X_m	0,3302	0,2545
	C	2,0918	2,6636
	K	0,6768	0,7362
	R^2	0,9070	0,8737
	%E	3,2433	3,8461
OSWIN	a	0,2529	0,2422
	b	0,5119	0,5048
	R^2	0,9877	0,9849
	%E	4,7017	4,9762
HALSEY	a	0,0781	0,0705
	b	1,577	1,6079
	R^2	0,982	0,9798
	%E	5,7678	5,8011

En las **Figuras 2** y **3** se presentan los datos experimentales y las curvas resultantes de aplicar los distintos modelos a 25 y 30°C respectivamente.

Figura 2. Isotermas de desorción de harina de topinambur precocido a 25°C, datos experimentales y su modelado.

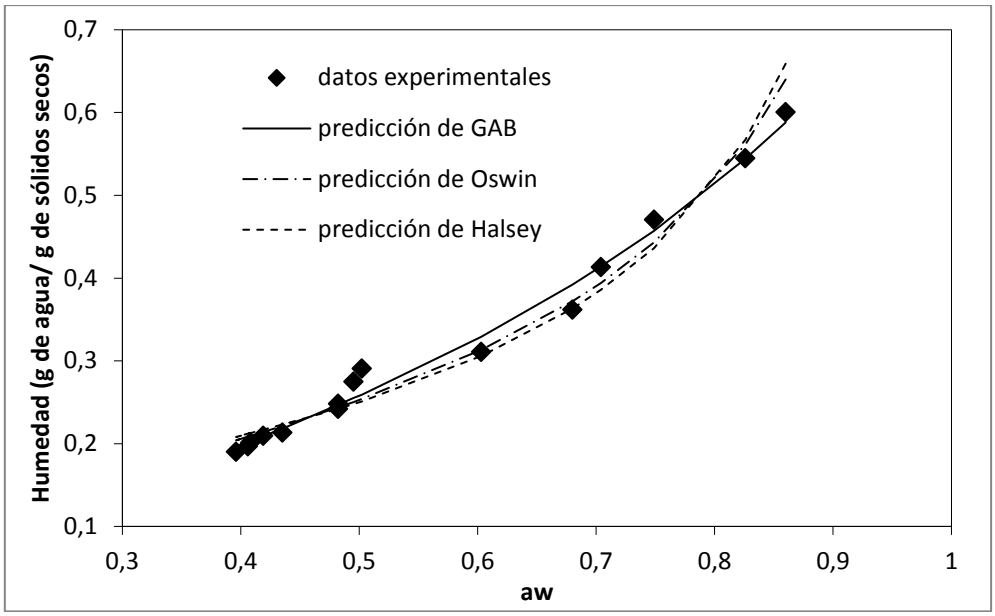
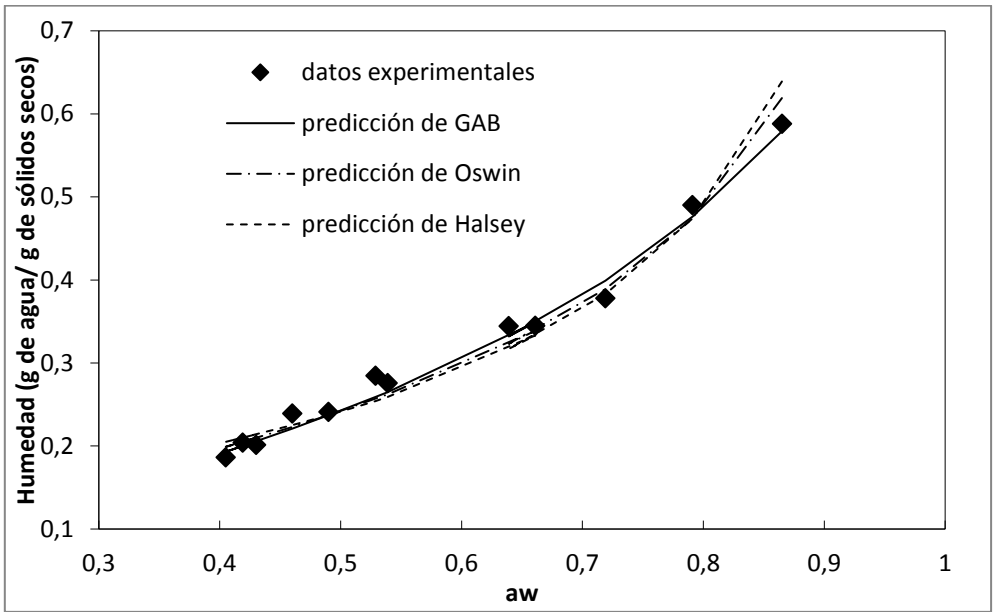

0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Humedad (g de agua/ g de sólidos secos)
datos experimentales
predicción de GAB
predicción de Oswin
predicción de Halsey
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1
aw

Figura 3. Isotermas de desorción de harina de topinambur precocido a 30°C, datos experimentales y su modelado.

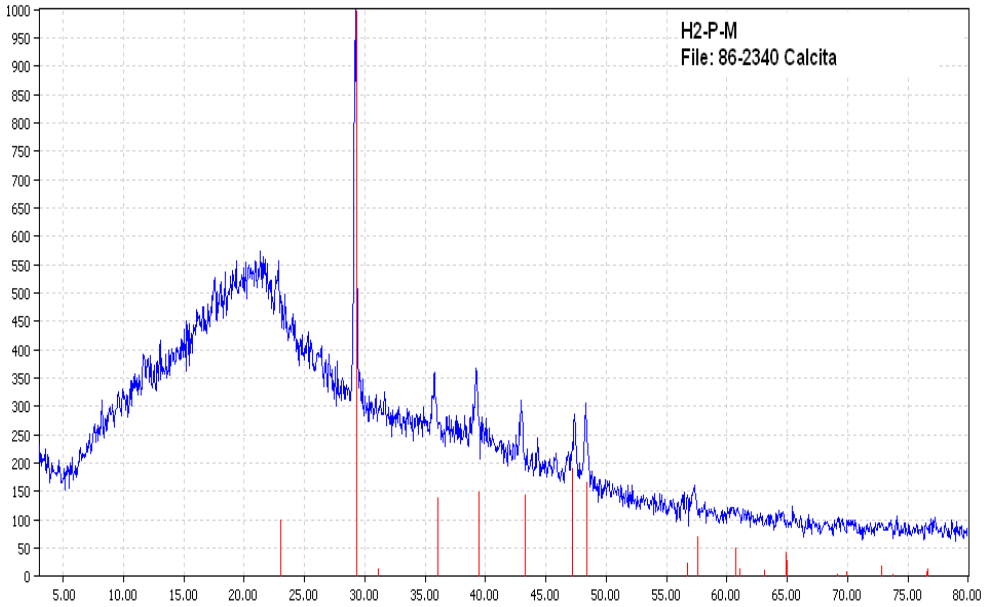


Difracción de rayos X

En la **Figura 4** se muestran los resultados de DRX, la muestra H2PM corresponde a la harina de topinambur precocido. La muestra fue mezclada físicamente con carbonato de calcio antes de realizar el estudio de DRX. A partir de la información disponible en la bibliografía abierta se conoce que los tubérculos de topinambur son pobres en almidón. Por otro lado, respecto a la estructura cristalina del almidón se registran diferentes señales en los difractogramas según el tipo de almidón encontrado: los almidones tipo "A", presentan picos de mayor intensidad de difracción para los ángulos 2θ = 15 y 23°, este patrón es típico de los almidones de cereales. El tipo "B" muestra señales de mayor intensidad de difracción para los ángulos 2θ = 5,6; 17 y 24° y se ha encontrado en almidones de tubérculos y de altos contenidos de amilosa. Existe un tipo de almidón C que es combinación de A y B. También hay un cuarto tipo de cristalinidad, tipo V, formado a partir de la cristalización de lípidos con amilosa que tiene señales de difracción en 12,6; 13,2; 19,6 y 20,4°.

En las muestras de topinambur precocido analizado no se encontraron señales correspondientes a ninguno de los mencionados previamente.

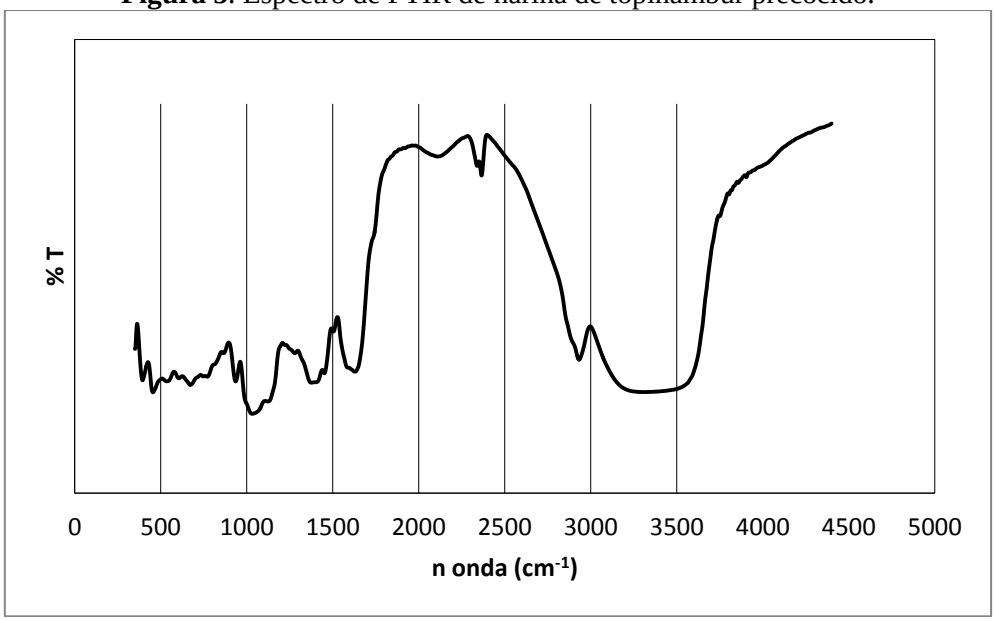
Figura 4. Diagrama de difracción de harina de topinambur precocido.



Espectroscopía infrarroja

En la **Figura 5** se muestra el espectro de FTIR de la muestra de harina de topinambur precocido. En la zona 3500 – 3000 cm^{-1} se observa una banda anca asociada al enlace O-H, también se registró una señal en 2900 cm^{-1} atribuible a un estiramiento asimétrico CH_2. En la zona del espectro entre 1500 y 900 cm^{-1} se detectaron señales asignadas a inulina (933 cm^{-1}) y glúcidos (1100 cm^{-1}) (Barkhatova et al. 2015). En este último rango es posible encontrar las señales asignadas a amilosa y amilopectina, pero ya ha sido descartada su presencia en el estudio de DRX.

Figura 5. Espectro de FTIR de harina de topinambur precocido.



Análisis termogravimétrico

En el análisis termogravimétrico (TGA) se registran las pérdidas de peso en las muestras de harina al ser sometidas a temperaturas hasta de 800°C. Esta pérdida de peso se debe a la deshidratación y a la

descomposición de elementos presentes en la harina. Como el análisis se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno se descartan las pérdidas de peso por oxidación que también podrían contribuir.
En los resultados del análisis termogravimétrico de harina de topinambur precocido, se observan tres grandes zonas: en la zona 1 desde la temperatura ambiente hasta 189°C corresponde a la pérdida de agua fisisorbida, en este caso corresponde a un 13,73% de la masa total. En la segunda zona podemos observar dos eventos caracterizados por diferentes velocidades de pérdida de peso, esta zona corresponde a la mayor cantidad de masa perdida y es atribuible a descomposición de carbohidratos y péptidos presentes en la muestra, se inicia con una temperatura de alrededor de 189°C, temperatura inicial de descomposición, y presenta un pico máximo a los 219°C.
La presencia de dos eventos en la zona de máxima pérdida de peso y la temperatura inicial de descomposición han sido asociadas (Lima et al. 2014) con el contenido de lípidos y la resistencia al calor de la harina (cuanto menor contenido de lípidos mayor estabilidad y mayor temperatura de inicio de degradación). Ambos eventos (zona 2) suman un 79,97%. En la etapa comprendida entre 309 y 530°C se presenta la descomposición de polisacáridos de elevado peso molecular como proteínas y lípidos.
En la tercera etapa comprendida entre 530°C hasta 800°C se registró una pérdida de peso equivalente a un 6,3%.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan información de la harina de topinambur precocido. Su composición química proximal corresponde a una fuente de fibras naturales, proteínas no formadoras de gluten, con un contenido de carbohidratos del 63,94% que incluye la presencia de inulina. Los estudios de FTIR permitieron verificar la presencia de este compuesto en la harina.
Las ecuaciones utilizadas para modelar las isotermas de desorción ajustaron adecuadamente los datos experimentales para las dos temperaturas de trabajo, obteniéndose valores de R^2 superiores a 0,87 y %E inferiores al 10%, siendo el modelo de GAB el que presentó menor error porcentual. El valor de humedad equilibrio de monocapa estimado varió entre 0,25 y 0,33 a 30°C y 25°C respectivamente, siendo este parámetro fundamental para definir las condiciones de almacenamiento.
Los resultados obtenidos de la difracción de rayos X (DRX) indican que en la muestra de harina de topinambur precocido no se encontraron almidones tipo A que son característicos de cereales ni almidones tipo B que suelen encontrarse en tubérculos.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 2000. Official Method of Analysis. 17th ed. Washington: International. pag 107.
Barkhatova T, Nazarenko M, Kozhukhova M, Khripko I. 2015. Obtaining and identification of inulin from Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus*) tubers. Foods and Raw Materials, 3: 13-22.
Choque Delgado G, Pastore G, Tamashiro W. 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. Food Research International, 43: 1231-1236.
Kaushal P, Kumar V, Sharma HK. 2012. Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. LWT-Food Science and Technology, 48:59-68.
Lima B, Lima F, Tavares M, Costa A, Pierucci A. 2014. Determination of the centesimal composition and characterization of flours from fruit seeds. Food Chemistry, 151: 293-299.
Madrigal M, Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Lationamericanos de Nutrición, 57: 387-396.
Mazza G. 1980.Thermodynamic considerations of water vapour sorption by horseradish roots. Lebensm. Wiss. Technol, 13: 13-17.
Mohamed A, Kouhila M, Jamali A, Lahsasni S, Mahrouz M. 2005. Moisture sorption isotherms and heat of

sorption of bitter orange leaves (*Citrus aurantium)*. Journal of Food Engineering, 67: 491-498.
Palou A, Serra F. 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación, Nutrición y Salud, 7:76-90.
Radovanovic A, Stojceska V, Plunkett A, Jankovic S, Milovanovic D, Cupara S. 2015. The use of dry Jerusalem artichoke as a functional nutrient in developing extruded food with low glycaemic index. Food Chemistry, 177: 81-88.
Roberfroid M. 1999. Caloric value of inulin and oligofructose. Journal of Nutritrion, 129: 1436 -1437.
Rubel I, Pérez E, Manrique G y Genovese D. 2015. Fibre enrichment of wheat bread with Jerusalem artichoke inulin: Effect on dough rheology and bread quality. Food Structure, 3: 21-29.
Scollo D, Ugarte M, Vicente F, Giraudo M, Sanchez Tuero H, Mora V. 2011. El potencial del topinambur en la salud y la nutrición. Diaeta, 29: 7-13.
Yang L, He Q, Corscadden K, Udenigwe C. 2015. The prospects of Jerusalem artichoke in functional food ingredients and bioenergy production. Biotechnology Reports, 5: 77-88.

AGRADECIMIENTOS
Agradecemos a la Universidad Nacional de San Luis y a CONICET por los subsidios otorgados. Agradecemos al Ing. Agr. Rodolfo Rossi por su trabajo en el cultivo y recolección de topinambur.

Identificación y cuantificación mediante HPLC-MS/MS de compuestos polifenólicos en micropartículas de fibras de ciruela (*Prunus salicina*)

Basanta M.F.[1,3], Marin A.[2], Gerschenson L.N.[1,3], Tomás-Barberán F.A.[2], Rojas A.M.[1,3]

1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias; Argentina.
(2) CEBAS-CSIC, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales; Murcia, España.
(3) CONICET.
florbasanta@gmail.com

RESUMEN

Se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas (MPCs) obtenidas a partir de la fibra extraída de pulpa y piel de las ciruelas. Luego de ser aislados con acetona/agua/ácido acético (70:29,5:0,5), los "fenólicos extraíbles" se analizaron por HPLC-DAD-MS/MS. Mediante la reacción de floroglucinólisis, previa a la extracción, se reveló la existencia de "proantocianidinas" (flavan-3-oles). Los "fenólicos extraíbles" encontrados fueron el ácido neoclorógenico, antocianinas (cianidina 3-galactósido y cianidina 3-rutinósido) y flavonoides (quercetina 3-galactósido, quercetina 3-rutinósido, quercetina 3-xilosa y quercetina 3-ramnósido), resultando mayor la cantidad de dichos compuestos en las MPCs de la piel. Las proantocianidinas resultaron ser el componente fenólico predominante, en cantidades semejantes tanto en la MPCs de la piel como de la pulpa (200 y 170 mg/100 g de MPCs, respectivamente), y caracterizadas por un grado de polimerización de 5. Las unidades de extensión estuvieron compuestas principalmente por epicatequina (≈77.2%) y tanto catequina como epicatequina fueron encontradas en las unidades terminales. Este estudio demuestra que pese al tratamiento con etanol utilizado en la obtención de las MPCs, éstas conservan compuestos polifenólicos co-extraídos con capacidad antioxidante, siendo por lo tanto promisoria su utilización para el desarrollo de ingredientes y/o aditivos funcionales para la formulación de alimentos.

Palabras clave: polifenoles, proantocianidinas, ciruelas, micropartículas, antocianinas.

ABSTRACT

Phenolic compounds co-extracted in the microparticles (MPCs) obtained from the pulp and skin fibers of plums were identified and quantified. After being isolated with acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5), the "extractable phenolics" were analyzed by HPLC-DAD-MS/MS. By means of the phloroglucinolysis reaction performed before the extraction with the solvent mixture, the existence of "proanthocyanidin" (flavan-3-ols) was revealed. The "extractable polyphenols" found in the MPCs were neochlorogenic acid, anthocyanins (cyanidin 3-galactoside and cyanidin 3-rutinoside) and flavonoids (quercetin 3-galactoside, quercetin 3-rutinoside, quercetin 3-xylose and quercetin 3-rhamnoside), with a higher amount of such compounds in the skin MPCs than in the pulp MPCs. Proanthocyanidins were the major phenolic components, with similar amounts in both skin and pulp MPCs (200 and 170 mg / 100 g of MPCs, respectively), and with a degree of polymerization of 5. The extension units were composed mainly by epicatechin (≈77.2%), which was also found as terminal units together with a very low proportion of catechin. This study shows that despite the ethanolic treatment performed to obtain the plum MPCs, they retain the co-extracted antioxidant polyphenolic compounds, being then promising their use as functional food ingredients and/or additives.

Keywords: polyphenols, proanthocyanidins, plums, microparticles, anthocyanins.

INTRODUCCIÓN

Las ciruelas se cultivan principalmente para ser consumidas frescas, como así también para la elaboración de dulces, mermeladas, jaleas y como frutas deshidratadas. Durante el proceso de cosecha, acondicionamiento, distribución y comercialización, así como durante la industrialización se producen pérdidas, generándose una importante proporción de residuos los cuales, al igual que ocurre con otras frutas y vegetales, son fuente importante de compuestos bioactivos antioxidantes tales como los polifenoles, y también de biopolímeros de la pared celular (ej. pectinas, fibra insoluble) (Basanta et al. 2012). Las fibras aisladas a partir de las ciruelas pueden ser co-extraídas con compuestos fenólicos, tal como fuera reportado para las fibras de mangos por Larrauri et al. (1997) y por Saura-Calixto (1998). Por lo tanto, las fibras pueden tener capacidad antioxidante natural, lo que las haría útiles como aditivos y/o ingredientes alimentarios funcionales. Durante el procesamiento de alimentos se pueden generar especies oxígeno reactivas, radicales y no radicales, a partir de la oxidación de lípidos y proteínas o de la ionización del agua intracelular (por ejemplo, radicales $^{\bullet}OH$, H_2O_2). Por lo tanto, se deben añadir antioxidantes para la preservación de los alimentos durante el procesamiento y el almacenamiento, prolongando la vida útil (Latorre et al. 2001). El desarrollo de nuevos ingredientes multifuncionales a partir de residuos y su aplicación en diferentes productos alimenticios como preservadores naturales constituye un importante desafío, además de contribuir a la disminución del volumen de los desechos y a agregar valor a la materia prima. El presente trabajo tiene como objetivo la identificación y la cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas (MPCs) que fueran obtenidas, en un estudio previo, a partir de la fibra separadamente extraída del mesocarpio (pulpa) y del exocarpio (piel) de ciruelas descartadas por tamaño luego de la cosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron ciruelas (*Prunus salicina)* descartadas por tamaño y formas irregulares.

Obtención de las MPCs

Una vez removido el exocarpio de los frutos, se obtuvieron separadamente las MPCs del exocarpio (piel) y del mesocarpio (pulpa) mediante un proceso de homogenización de cada tejido a alta cizalla en un Ultra Turrax T25, Alemania), utilizando etanol frío 80% v/v (500 g de fruta/2L de EtOH). El homogenato fue hervido por 30 min, luego enfriado y centrifugado. El material insoluble se volvió a tratar a alta cizalla con etanol 95 % (v/v), luego fue centrifugado a 10.000 rpm a 4ºC, evaporado bajo campana para eliminar el etanol (23ºC), congelado en freezer a –20ºC y liofilizado. Mediante tamizado, se seleccionaron las MPCs de granulometría menor a 420µm (Basanta et al. 2016).

Extracto de compuestos fenólicos

Las MPCs de piel y pulpa (2,5 g) fueron sonicadas durante 15 min y suspendidas en 20 mL del solvente de extracción (acetona/agua/ácido acético 70:29,5:0,5 (v/v/v)) (García-Viguera et. al. 1998). Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 15 min a 4ºC. Se evaporó la acetona a 35ºC, bajo presión reducida. El residuo acuoso fue sembrado en una columna (Sep-Pack C18 Waters, EEUU), lavado con 10 ml de agua y eluído con 1 mL de MeOH. Se filtró mediante una membrana de 0,45 micrones de poro para ser analizado por HPLC.

Análisis de los polifenoles extraíbles por HPLC-DAD-MS-MS

El análisis cromatográfico se realizó utilizando la técnica descripta por Basanta et al. (2016) utilizando un equipo HPLC-DAD-MSn/ESI Agilent HPLC 1200 serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), provisto con una bomba binaria (modelo G1376A), un inyector automático (modelo G1377A) refrigerado a 4.0°C (modelo G1330B), un desgasificador (modelo G1379B) y un detector de arreglo de diodos (modelo G1315D). El equipo de HPLC se controló mediante el software ChemStation (Agilent, v. B.01.03-SR2). Además, se utilizó un detector de masa de trampa iónica Bruker (modelo HCT Ultra, Bremen, Alemania) con fuente de ionización electrospray (ESI) controlado mediante el software (LCMSD, Agilent, v. 6.1). La identificación de los picos se realizó mediante sus espectros UV y espectros de masa con sus correspondientes fragmentaciones. La cuantificación de los compuestos identificados se llevó a cabo

mediante HPLC-DAD utilizando el método de estándares externos. Los ácidos fenólicos fueron cuantificados como ácido clorogénico a 320 nm., los flavonoides como quercetina-3-rutinósido a 360 nm y las antocianinas como cianidina-3-glucósido a 520 nm. Los resultados se expresan como miligramos cada 100 g de MPCs. Las muestras se analizaron por triplicado.

Análisis de las proantocianidinas

Para la determinación de proantocianidinas (flavan-3-oles) se utilizó la técnica de Kennedy y Jones (2001), con modificaciones de (Kennedy y Taylor 2003). Se utilizó el mismo equipo HPLC-DAD-MSn/ESI mencionado previamente. El análisis cromatográfico se realizó utilizando la técnica descripta por Basanta et al. 2016. El grado de polimerización (Dpn) se calculó como la suma de todas las subunidades (flavan-3-oles monómeros y los aductos de floroglucinol, mg) dividido por la suma de todos los monómeros de los flavan-3-oles (mg).

RESULTADOS Y DICUSIÓN

Polifenoles extraibles

Los compuestos fenólicos extraíbles que permanecieron retenidos en las MPCs de la pulpa y piel de las ciruelas, fueron determinados a partir de los extractos concentrados metanólicos obtenidos luego de la extracción con acetona/ agua/ ácido acético y analizados mediante HPLC-DAD y HPLC-ESIMS. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**, donde los compuestos fenólicos se identificaron a partir de los picos de los cromatogramas reportados en la **Figura 1**. De la observación de los perfiles de HPLC-DAD registrados a 280, 320, 360 y 520 nm de longitud de onda (**Figura 1**), se puede inferir que algunos de los principales compuestos fenólicos presentes en las MPCs de la piel son las antocianinas (**Tabla 1**). Estos flavonoides solubles en agua son los únicos compuestos fenólicos que se observan en el espectro visible (520 nm), los cuales son las responsables del color púrpura intenso de las MPCs de la piel. Sólo dos picos cromatográficos mostraron una longitud de onda máxima (λ_{max}) de absorbancia a 520 nm. Estos fueron identificados por su espectro ESI MS-MS que muestra el fragmento característico a m/z 447 con un fragmento de MS^2 en m/z 285 correspondiente a la cianidina 3-galactósido y un fragmento a m/z 593 con un MS^2 en m/z 285 para la cianidina 3-rutinósido (**Tabla 1**). Proponemos que se trata de cianidina 3- galactósido en lugar de cianidina 3-glucósido, porque la galactosa es el principal azúcar neutro que se encontró en las paredes celulares de las ciruela (Basanta et al. 2012). Como se observa en la **Figura 1**, el resto de los compuestos fenólicos muestran los máximos de absorbancia en el espectro UV (280, 320 y 360 nm). Se detectaron cuatro flavonoides diferentes (derivados de la quercetina con diferentes sustituyentes de azúcar). Dos de ellos coinciden en el tiempo de retención (Fig. 1 - Pico 8; **Tabla 1**). Estos cuatro flavonoides se caracterizaron sobre la base de la forma de sus espectros UV-visible, con un máximo de absorción a 360 nm. A través de la comparación con literatura, estos compuestos también se identificaron por su $[M-H]^-$ con m/z de 463, 609, 433, 447, con un pico base MS^2 en m/z 301 (Tabla 1) como quercetina 3-galactósido, quercetina 3-rutinósido, quercetina 3-xilósido y quercetina 3-ramnósido. La quercetina 3-galactósido y quercetina 3-rutinósido (**Fig. 1**, Pico 6 y 7, **Tabla 1**) se cuantificaron juntas como un único pico porque no fue posible separarlos en las condiciones cromatográficas usadas en el presente trabajo. Por otro lado las cantidades de quercetina 3-xilósido y quercetina 3-ramnósido (**Fig. 1** - pico 8) también se informan juntas sus concentraciones en la **Tabla 1**. Se ha informado que en los frutos rojos, la contribución de los compuestos fenólicos individuales a la capacidad antioxidante total depende en general de su estructura y de su concentración. Compuestos como quercetina y cianidina con sustituyentes 3',4'-dihidroxi en el anillo B y la conjugación entre los anillos A y B, han demostrado ser altamente eficaces en capturar radicales libres en los arándanos (Zheng y Wang 2003). Además se detectó un derivado del ácido hidroxicinámico, con un tiempo de retención 6,9 min y una concentración de 0,49 y 0,42 mg por 100 g de MPCs de piel y pulpa, respectivamente (**Tabla 1**). Este pico muestra un típico espectro UV con un máximo de absorbancia a 320 nm. En su espectro de masa se identificó un $[M-H]^-$ a m/z 353 con un fragmento MS^2 a m/z 191, siendo asignado al ácido neoclorogénico, debido a que es el principal derivado del ácido hidroxinámico encontrado en las ciruelas y previamente

reportado por Jaiswal et al. (2013).

En el cromatograma registrado a 280 nm (**Fig. 1**) y en el espectro HPLC-ESI-MS, se detectó la presencia de proantocianidinas (flavan-3-oles). En la **Figura 1**, el pico 2 fue identificado como un dímero de proantocinidina con el característico $[M-H]^+$ a m/z 577 y su MS^2 a m/z 424 (fragmento de *retro*-Diels Alder) y m/z 288, fragmento correspondiente al residuo de catequina. Haciendo un análisis detallado en los tiempos de retención entre 10 y 20 min, se encontraron trímeros (m/z 865) y tetrámeros (m/z 1153) de procianidinas, siendo los responsables de dar la forma de montaña a la línea de base en el cromatograma registrado a 280 nm (**Fig. 1**), entre esos tiempos de retención. El mismo perfil de polifenoles se obtuvo para las MPCs de la pulpa, pero las concentraciones fueron considerablemente menores (**Tabla 1**). Se puede observar que el contenido total de cianidina es de 12.1 mg/100 g de MPCs de piel y 0.77 mg/100 g de MPCs de pulpa. Esto confirma que la pulpa contiene los mismos compuestos fenólicos extraíbles que la piel.

Tabla 1. Análisis de los compuestos fenólicos de las MPCs de piel y pulpa de ciruela por HPLC-DAD y HPLC-ESIMS.

Compuestos fenólicos	Nº de pico	HPLC-UV-DAD (nm)	HPLC-ESIMS (m/z)	Piel (mg/100 g of MPCs)	Pulpa (mg/100 g of MPCs)
Hidroxicinamatos					
neoclorogénico	**1**	320	353, 190,8	0,49 ± 0,03	0,42 ± 0,05
Flavan-3 oles					
dímero de procianidina	**2**	280	577, 425,288		
Antocianinas					
cianidina 3-galactósido	**4**	520	447, 285	8,5 ± 0,1	0,64 ± 0,05
cianidina 3-rutinósido	**5**	520	593, 285	3,6 ± 0,3	0,13 ± 0,04
Flavonoides					
Quercetina-3-galactósido	**6**	360	463, 301	4,8 ± 0,2	0,93 ± 0,06
quercetina 3-rutinósido	**7**	360	609, 301		
quercetina 3-xilósido	**8**	360	433, 301	3,6 ± 0,5	0,51 ± 0,03
quercetina 3-ramnósido	**8**	360	447, 301		

Hidroxinamatos cuantificado como acido clorogénico, flavonoles como quercetina 3-rutinosido y Cianidinas como cianidina 3-glucosido.

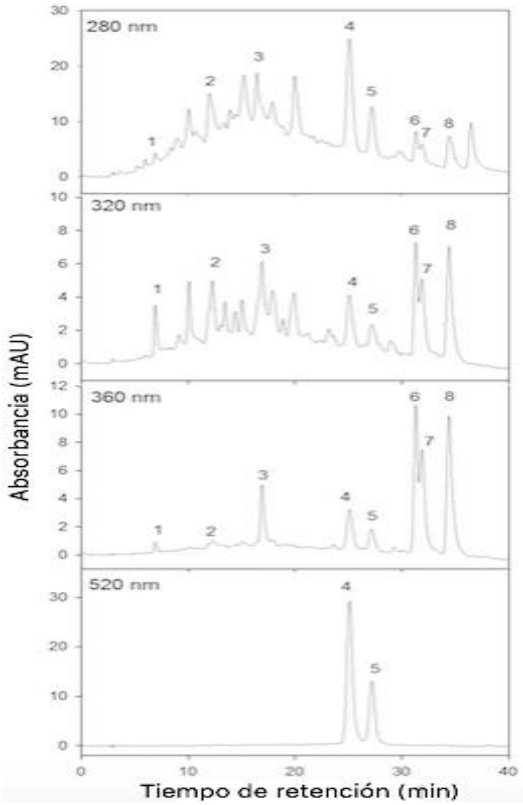


Figura 1. HPLC cromatograma obtenido a 280, 320, 360, y 520 nm de los compuestos fenólicos extraídos de las MPCs de piel. Picos: 1, ácido neoclorogénico; 2, dimero de procianidina; 3,compuesto no identificado; 4, cianidina 3-galactósido; 5, cianidina 3-rutinósido; 6, quercetina 3-galactósido; 7, quercetina 3-rutinósido; 8, quercetina 3-xilosa y quercetina 3-ramnósido.

Proantocianidinas

Las proantocinidinas se caracterizaron luego de la hidrólisis en presencia de exceso de floroglucinol y posterior análisis mediante HPLC-MS-MS (**Figura 2**). Estos compuestos fueron encontrados en las MPCs de fibra de ciruela como el principal componente fenólico (**Tabla 2**). Estos oligómeros están presentes en cantidades mucho más altas que los compuestos fenólicos extraíbles aquí determinados (**Tabla 3**) y en cantidades similares en las MPCs obtenidas de la piel y de la pulpa (200 y 170 mg/100 g de MPCs, respectivamente). El grado de polimerización (DPn) de las proantocinidinas corresponde a cinco residuos fenólicos (≈5.15) (**Tabla 4**). El análisis muestra que las unidades de extensión de los oligómeros están esencialmente constituidas por epicatequina (EP) en ≈ 77.2%, similar a lo reportado en las semillas y pulpa de cupuassu (Pugliese et al. 2013) y en el cacao (Tomás-Barberán et al. 2007). Una muy baja proporción de catequina se encuentra en las unidades de extensión (CTe). Tanto epicatequina (EP) como catequina (CT) están presentes como unidades terminales aunque EP es 12 veces mas abundante que CT (**Tabla 2**) lo que concuerda con reportes previos de análisis de proantocinidinas en diferentes frutas (Buendía et al. 2010; Pugliese et al. 2013). Las proantocinidinas constituidas por unidades de (−)-epicatequina y (+)-catequina son llamadas procianidinas por que sólo las cianidinas son liberadas en medio ácido. Procianidinas comprende la clase más grande de proantocianidinas (Choy y Waterhouse 2014). Su composición tiene importancia biológica ya que se sabe que la epicatequina es mejor absorbida en el intestino que la catequina (Baba et al. 2001), mientras que los monómeros y dímeros pueden ser absorbidos mejor que las grandes oligómeros de proantocianidina (Lotito et al. 2000).

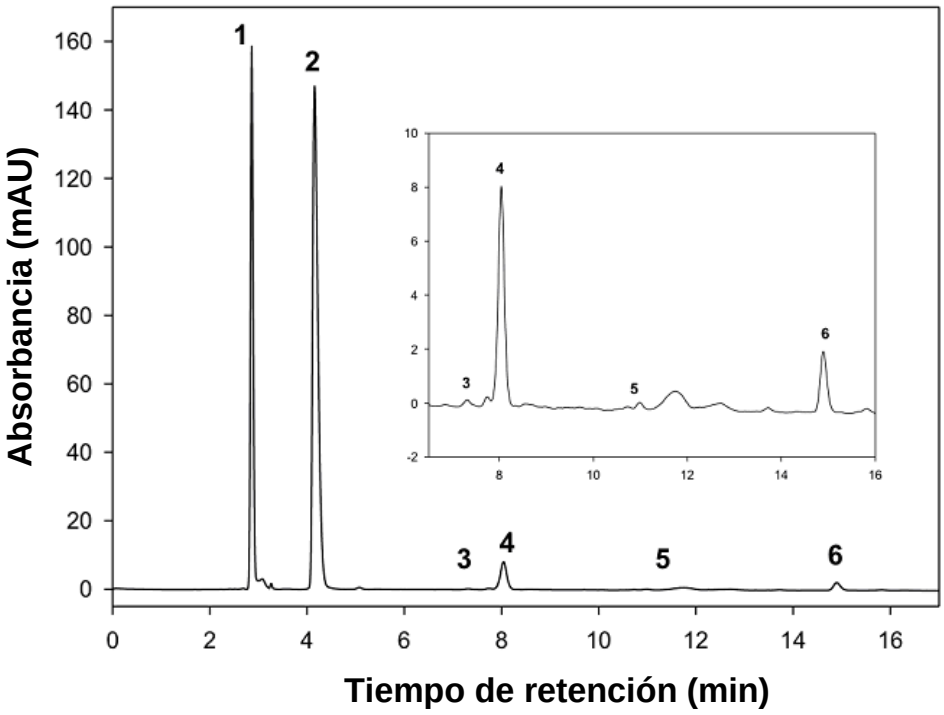


Figura 2. HPLC-DAD cromatograma (280 nm) de los productos de lisis de las proantocianidinas luego de la floroglucinólisis obtenidos de los extractos de las MPCs de piel. Pico: 1, exceso de floroglucinol; 2, exceso de L-(+)-ácido ascorbico; 3, aducto de catequina; 4, aducto de epicatequina; 5, catequina; 6 epicatequina.

Tabla 2. Caracterización y contenido de proantocinidinas (miligramo por 100 gramos de microparticulas) obtenidas de la piel y pulpa de las ciruelas**.**

DPn	Proantocinidinas totales	CTe(%)	EP(%)	CT(%)	EPt(%)

Piel	5.1 ± 0.3	200 ± 20	3.3 ± 0,1	77.2 ± 0.3	1.5 ± 0.3	18 ± 1
Pulpa	5.2 ± 0.1	170 ± 10	3.6 ± 0,1	77.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	18 ± 1

Los valores representan las medidas ± desviación estándar (n=3). DPn, significa grado de polimerizacion; CTe, unidades de extension de catequina; EP, unidades de estension de epicatequina; CTt, unidades terminal de catequina; EPt, unidades terminal de epicatequina.

Las proantocianidinas no están disponibles para su absorción desde matrices sólidas. Deben primero ser disueltas en la fase acuosa para estar accesibles a los enterocitos de la superficie del intestino delgado, donde son absorbidos por difusión pasiva (Ou y Gu 2014). En sus formas dimérica, trimérica y tetramérica, las proantocianidinas son absorbidas en sus formas intactas en el intestino delgado a velocidades menores al 10% de aquella a la que es absorbida la epicatequina libre. Por ello, las proantocianidinas oligoméricas pueden permanecer más tiempo en la luz intestinal hasta ser absorbidas, interviniendo en el metabolismo del enetrocito. Proantocianidinas pentaméricas y de mayor DPn son pobremente absorbidas en el intestino delgado y por lo tanto, son los únicos antioxidantes de la dieta que llegan al colon a niveles de hasta varios cientos de micromoles/litro (Choy y Waterhouse 2014). Por ello, sus efectos saludables pueden no requerir su absorción sino su acción regulatoria relacionada con la señalización celular mediante su interacción con proteínas de membrana, y mediante la protección de la integridad de la barrera intestinal a través de mecanismos de acción que incluyen su capacidad antioxidante y anti-inflamatoria, contribuyendo a la salud del colon. Martín *et al* (2008) demostraron que los extractos de polifenoles obtenidos de cocoa en polvo conteniendo dímeros y trímeros de procianidinas tienen la habilidad de proteger lineas celulares de hepatocitos humanos contra la injuria oxidativa, mediante la modulación de la concentración de GSH, la generación de ROS, la producción de malondialdehido y la producción y actividad de enzimas antioxidantes. Las proantocianidinas son también catabolizadas en una relevante proporción por la microbiota del colon, antes de que ésta absorba los catabolitos resultantes de ello, los que incluyen ácidos fenólicos y fenil-γ-valerolactonas (Ou y Gu 2014).

CONCLUSIONES

Las MPCs obtenidas a partir de ciruelas mediante extracción etanólica, constituidas por los polímeros de la pared celular (fibra) del mesocarpio y del exocarpio, contienen compuestos fenólicos asociados. Se encontró que las proantocianidinas son el principal componente de los compuestos fenólicos de las MPCs tanto de la piel como de la pulpa, estando presente en una proporción similar en ambas. Las MPCs de la piel presentan mayores conentraciones de polifenoles extraibles que las de la pulpa. Por lo tanto, pese al tratamiento con etanol utilizado para la obtención de las MPCs, éstas conservan compuestos polifenólicos co-extraídos, con capacidad antioxidante, siendo por lo tanto promisoria su utilización para el desarrollo de ingredientes y/o aditivos funcionales a ser aplicados en la formulación de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. 2001. In vivo comparison of the bioavailability of (+)- catechin, (−)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. The Journal of Nutrition, 131: 2885–2891.

Basanta MF, Marin A, De Leon S, Gerschenson LN., Erlejman AG, Tomás-Barberán FA, Rojas AM 2016. Antioxidant Japanese plum (Prunus salicina) microparticles with potential for food preservation. Journal of Functional Foods, 24: 287-296.

Basanta, MF, Ponce NMA, Rojas AM, Storz CA. 2012. Effect of extraction time and temperature on the characteristics of loosely bound pectins from Japanese plum. Carbohydrate Polymers, 89: 230–235.

Buendía B, Gil MI, Tudela JA, Gady AL, Medina JJ, Soria C, Tomás-Barberán, FA. 2010. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 3916–3926.

Choy YY, Waterhouse AL. 2014. Proanthocyanidin. Metabolism, a mini review. Nutrition and Aging, 2: 111–116.
García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán, FA. 1998. The use of acetone as extraction solvent for strawberry fruit anthocyanins. Phytochemical Analysis, 9: 274–277.
Jaiswal R, Karaköse H, Rühmann S, Goldner K, Neumüller M, Treuter D, Kuhnert, N. 2013. Identification of phenolic compounds in plum fruits (Prunus salicina L. and Prunus domestica L.) by high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 12020–12031.
Kennedy JA, Jones GP. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:1740–1746.
Kennedy JA, Taylor A. 2003. Analysis of proanthocyanidins by high performance gel permeation chromatography. Journal of Chromatography. A, 995: 99–107.
Larrauri J, Rupérez P, Saura-Calixto F. 1997. Mango peel fibres with antioxidant activity. European Food Research and Technology, 205: 39–42.
Lotito SB, Actis-Goretta L, Renart ML, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, Steinberg FM, Keen CL, Fraga, CG. 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of proanthocyanidins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 276: 945–951.
Martín MA, Ramos S, Mateos R, Granado Serrano AB, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, Goya L. 2008. Protection of human hepg2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 7765– 7772.
Ou K, Gu L. 2014. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. Journal of Functional Foods, 7: 43–53.
Pugliese AG,Tomas-Barberan, FA, Truchado P, Genovese, MI. 2013. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of Theobroma grandiflorum (Cupuassu) pulp and seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 2720–2728.
Saura-Calixto, F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. Journal of Agriculture and. Food Chemistry, 46: 4303–4306.
Tomás-Barberán FA, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, Muguerza B, Gil-Izquierdo A, Cerda B, Zafrilla, P, Morillas J, Mulero J, Ibarra A, Pasamar M A, Ramon D, Espin JC. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 3926–3935.
Zheng W, Wang SY 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 502–509.

AGRADECIMIENTOS
Se agradece el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET y ANPCyT.

Fibra insoluble de brácteas de *Zea mays*: efecto sobre las propiedades mecánicas de una película compuesta

Bernhardt DC [1,3], Pérez CD [2,4], Fissore EN [1,4], De'Nobili MD [1,4], Rojas AM [1,4].

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias.
(2) ITA, INTA-Castelar, Morón, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
(3) Becario o (4) Miembro del CONICET.
dana@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Con el objeto de evaluar las brácteas del maíz *Zea mays* como fuente de fibras útiles para el desarrollo de materiales, se realizaron ensayos sobre la **fibra insoluble en agua** (**FIA**) de las mismas, empleándola como relleno en películas compuestas a base de **pectina de bajo metoxilo** (**PBM**) entrecruzada con Ca^{2+}. Para ello, se fabricaron dos sistemas de películas, a partir de una solución acuosa de PBM, conteniendo sorbato de potasio y glicerol, uno sin y otro con agregado de FIA (8g/100g PBM).Tras equilibrarlas a 57,7% **de humedad relativa** (**HR**), se analizó su influencia en el desempeño mecánico y la **permeabilidad al vapor de agua** (**PVA**).

Con el valor del **esfuerzo** (σ_{rup}) y **elongación relativa** (ε_{rup}) a ruptura de las películas equilibradas se calculó la **resistencia** (**R**= $\sigma_{rup}/\varepsilon_{rup}$). Se observó que ésta disminuyó de 87 a 58 MPa, debido al agregado de la FIA, demostrándose que 8% de FIA es una elevada proporción de carga para la película. Al no observarse cambios en ε_{rup} (≈9%), se evidencia que ambas formulaciones (0% y 8% FIA) alcanzan un grado de plastificación similar. El agregado de FIA disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la PVA, atribuible a su grado de cristalinidad (32%).

Palabras clave: residuos de maíz, fibra insoluble, películas compuestas, resistencia tensil, permeabilidad.

ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate the corn husk as a source of useful fiber for material development. Its **water insoluble fiber** (**WIF**) was analysed, using it as a filler of composite films made with **low methoxyl pectin** (**LMP**) crosslinked with Ca^{2+}. Two systems of films using an aqueous solution of LMP with and without WIF (8g/100g LMP) were made, plus adding potassium sorbate and glycerol to both of them. After reaching the equilibrium at 57.7% of **relative humidity** (**RH**), the influence in the mechanical performance and the **permeability to water vapour** (**WVP**) were assessed.

Once the values of **stress** (σ_{rup}) and **strain** (ε_{rup}) to rupture were obtained, the **tensile strength** (**R**= $\sigma_{rup}/\varepsilon_{rup}$) was able to be calculated. The R value was observed to decrease from 87 to 58 MPa due to the addition of WIF, which could mean that 8% of WIF is a very high amount of filler for the film. Since the ε_{rup} remained unmodified (≈ 9%), it could be considered that both formulations (0% and 8% WIF) reached a similar plasticizer degree. The charge of WIF significantly ($p<0, 05$) decreased the WVP, attributable to the crystallinity (32%) of the film filler.

Key words: corn stover, insoluble fiber, composed films, tensile strength, permeability

INTRODUCCIÓN

Argentina es un importante productor y exportador de maíz *Zea mays* (familia *Poceae*). Su cosecha e industrialización genera un gran volumen de residuos, como tallos, hojas, mazorcas y brácteas (Dhugga 2007). Los subproductos de la industria agrícola, en los últimos años han sido considerados como una fuente

de ingredientes funcionales, tales como antioxidantes y fibra dietaria (Galanakis 2013). Asimismo, la industria alimentaria y el mercado impulsan la reutilización de estos remanentes, ya que son ricos en fibra dietaria, oligosacáridos funcionales y fitoquímicos. En este sentido, las brácteas de maíz podrían ser aprovechadas como fuente valiosa de fibra al ser empleadas para el desarrollo de materiales como películas compuestas biodegradables.

Debido a la fuerte demanda en aumento por parte de los consumidores, de alimentos de alta calidad y larga vida útil junto con la preocupación sobre el empleo de químicos sintéticos como conservantes de alimentos y su uso excesivo, han motivado a investigar nuevas estrategias para la conservación de los alimentos. Una película biodegradable empleada como recubrimiento de un alimento procesado, podría constituir un nuevo obstáculo tecnológico de preservación de alimentos, actuando tanto como barrera a la difusión de gas como siendo portadora de conservantes (antioxidantes, antimicrobianos), en las interfaces de su microestructura. De esta manera, colaboraría con la estabilización, permitiendo una actividad localizada, mediante la liberación controlada de los conservantes contenidos en su matriz (De'Nobili et al. 2013). Al momento de desarrollar películas aptas para su consumo, es necesario que las mismas estén constituidas principalmente por polisacáridos y proteínas. Estos componentes, si bien conforman una barrera muy buena para los gases como el oxígeno, perjudicial para la estabilidad del producto, no lo son para el vapor de agua. Por lo tanto, en la actualidad se está investigando cómo disminuir la **permeabilidad al vapor de agua** (**PVA**) de las películas comestibles, al mismo tiempo que mejorar sus propiedades mecánicas. Huq et al. (2012), han fabricado películas por recubrimiento de alginato de sodio (3% p/v solución acuosa), entrecruzadas mediante inmersión en una solución de $CaCl_2$ al 1% p/p, reforzadas con una celulosa nanocristalina (1-8% p/p base seca) obtenida a partir del proceso comercial de blanqueado de una pulpa *kraft* de madera blanda. La PVA de las películas de alginato (25ºC; gradiente de **humedad relativa -HR-** 0%/60%), se vio disminuida conforme la concentración de celulosa nanocristalina aumentaba desde 0% (6.37×10^{-11} $g.m^{-1}.s^{-1}.Pa^{-1}$) hasta 8%p/p (4.05×10^{-11} $g.m^{-1}.s^{-1}.Pa^{-1}$). A su vez, la **resistencia tensil** (**R**= $\sigma_{rup}/\varepsilon_{rup}$)de las películas equilibradas a 56%HR aumentó de manera casi lineal desde 57MPa para 0%- hasta un máximo de 78MPa para las películas con 5%-celulosa nanocristalina, mientras que a mayores concentraciones de celulosa (8%) no se apreció un aumento de la resistencia (75MPa). Sin embargo, se pudo apreciar un comportamiento inverso en cuanto a la elongación relativa evaluada a ruptura de las películas, donde ésta disminuyó de 10% a 4,8% para películas con 0% y 8% p/p de nanopartículas, respectivamente. Shekarabi et al. (2014), determinaron que el agregado de partículas de nanoarcillas (no comestible) (0.5, 1, 1.5 y 2g/100g semillas de membrillo) a películas hechas por recubrimiento, a partir de una solución acuosa de mucílago de semillas de membrillo (10% p/p), plastificadas con glicerol (5g/100g polímero), disminuyó la PVA (gradiente 0%/52% HR; 25ºC) desde 1.86×10^{-10}a 0.306×10^{-10} $g.m^{-1}.s^{-1}.Pa^{-1}$, al cabo de un mes de almacenamiento. Adicionalmente, se apreció un mejoramiento de la resistencia tensil desde 16 a 22MPa, y un aumento de la elongación relativa desde 2,48% a 6,5%, tras medir las películas a 2 mm/min. En otro trabajo publicado por Andrade et al. (2016), se fabricaron películas comestibles a partir del residuo sólido de frutas y verduras enteras (por ejemplo naranja, sandia, lechuga, zanahoria, espinaca, piel de papa), el cual fue reducido a harina y suspendido en agua (8 y 10% p/p) para su empleo. Las películas fueron almacenadas a 0% HR hasta su caracterización. La PVA observada (gradiente de HR 0/100%; 25ºC), varió entre 6,81 y 7.72×10^{-10} $g.m^{-1}.s^{-1}.Pa^{-1}$, mientras que la resistencia tensil a fractura aumentó desde ≈ 27 kPa a 70-84 kPa con la adición de piel de papa, acompañada siempre por un 30,5-34,5% de elongación.

Considerando su composición química, la **fibra insoluble en agua** (**FIA**) de las brácteas de maíz se propone como relleno o carga, capaz de disminuir la PVA de películas de pectina de bajo metoxilo (PBM) entrecruzadas con calcio, y de mejorar sus características de superficie y fuerza mecánica. Para ello, se evaluaron los efectos del agregado de un 8% FIA a las películas, sobre el desempeño de las películas compuestas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fibras de brácteas de maíz

Las fibras de brácteas de maíz fueron reducidas de tamaño mediante un molino de corte provisto de un tamiz de malla de 500 µm. El polvo resultante fue fraccionado empleando una serie de tamices vibratorios, obteniéndose un tamaño de partícula promedio de 53 µm (malla ASTM 270). Una masa de polvo de brácteas se trató con agua desionizada (1:1000 p/ v) a temperatura ambiente por 24h bajo agitación magnética, se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio (Whatman GF/C, RU) y se enjuagó con agua. Una vez liofilizado el residuo resultante, se obtuvo la fibra insoluble en agua. Posteriormente, se tomó una masa de FIA tal para lograr una proporción de 8g/100g pectina, se dispersó en 25,00 ml de agua desionizada empleando agitación magnética, y se dejó reposar el sistema por 18hs. Ésta última dispersión fue utilizada como carga o relleno de las películas compuestas fabricadas.

Preparación de las películas compuestas

Se produjeron dos soluciones con distinto contenido de FIA para fabricar las películas, una sin agregado de fibra insoluble (0%) y otra con una proporción de FIA de 8g cada 100g de pectina (8%). Ambas soluciones se realizaron de igual modo. Brevemente, se tomaron8g de pectina comercial GENU™, con un contenido de PBM de 5,25g, y se dispersaron en ≈250.00g de agua desionizada. Para lograr una hidratación homogénea del polvo de pectina, la dispersión se realizó bajo agitación constante, empleando un agitador vertical (LH, Velp Scientifica, Italy), con una velocidad de cizalla elevada (1,400 rpm-constante). Se elevó la temperatura del sistema hasta los 90ºC (5ºC/min) bajo agitación constante, y se adicionó sorbato de potasio (0,0900g) y glicerol (2,4000g) como plastificante. Finalmente, se adicionaron 0.5000g de $CaCl_2.2H_2O$, manteniendo el sistema a 90°C. De esta manera, se obtuvo la solución para fabricar las películas con 0% de FIA. Para la solución con 8% de FIA, se adicionó la dispersión de polvo de brácteas (25,00 ml) a la solución anterior, siempre bajo agitación constante, previamente al agregado de $CaCl_2.2H_2O$.Luego, para ambas formulaciones, se llevó el peso total de la solución a 300,00g agregando agua desionizada (De'Nobili et al. 2013). La solución caliente se sometió bajo presión de vacío con el propósito de eliminar las burbujas de aire presentes, a continuación se dispensó una masa determinada sobre placas de poliestireno (200×200mm), niveladas horizontalmente y numeradas, asegurando así la formación de una capa fina uniforme en cada placa. Las mismas se dejaron enfriar a temperatura ambiente para lograr la gelificación de la solución, posteriormente se efectuó su secado (60°C, 3horas) por convección. Se obtuvieron entonces las películas, al despegarlas cuidadosamente de las placas. Se almacenaron al vacío (25,0° C) en un desecador conteniendo una solución saturada de NaBr (actividad de agua, a_W^o = 0.577), a fin de mantener una HR constante (57,5%) para equilibrar las películas (**Ec. 1**) (Greenspan 1977). Se fabricaron tres lotes de películas (triplicados) para cada concentración de FIA (0% y 8%) estudiada, numerando cada película a fin de lograr la trazabilidad de cada muestra analizada.

Se midió diariamente por triplicado la a_W de las películas a 25,0°C, mediante un equipo Decagon AquaLab (Serie 3 Water activity meter, E.E.U.U.), para determinar el momento en que se alcanzó el equilibrio de las películas, denominado equilibrio de humedad relativa (EHR) (**Ec. 1**).

$$a_W = ERH/100 \qquad (1)$$

Ensayos de Tensión

Las películas equilibradas a 57,7% de HR se cortaron con un sacabocados en tiras de bordes paralelos (25.0 mm × 6.0 mm). Cada tira fue sometida a un ensayo de tensión uniaxial hasta su ruptura (5 mm/min-velocidad constante de las mordazas), mediante una máquina Universal de testeo Instron (modelo 3345, Norwood, MA, E.E.U.U.) provista de una célula de 100N de carga y mordazas neumáticas con caras paralelas recubiertas con caucho. Con los valores de fuerza (N)- elongación (m) adquiridos, fue posible calcular el **esfuerzo** (σ_{rup}) y la **elongación relativa** (ε_{rup}) a ruptura:

$$\sigma_{rup} = F_{rup} / A_O \qquad (2)$$

$$\varepsilon_{rup} = \left(L_{rup} - L_O\right) / L_O \qquad (3)$$

Siendo A_O el área de sección transversal inicial de cada película, L_O la distancia inicial de separación entre las mordazas que sostienen la probeta de película, L_{rup} el largo de la película y F_{rup} la fuerza, ambos registrados al momento de ruptura de la película. Se midieron al menos catorce replicas para cada concentración de FIA.
El espesor de cada película fue medido con un micrómetro digital (Mitutoyo, Kawasaki, Japon), precisión de 0,001 mm, en tres zonas distintas de cada espécimen, previo a realizar el ensayo de tensión.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA de las películas fue determinada y calculada de acuerdo con la corrección para películas hidrofílicas de Gennadios et al. (1994). Cada muestra se colocó entre una masa determinada de calcio anhidro contenida en una celda, y la HR ambiental de 70%, a 25°C (Ibertest chamber, España).

Análisis Estadístico

Los resultados han sido informados como el promedio y desviación estándar para *n* réplicas de cada muestra, luego de analizarlas mediante ANOVA (nivel de significancia, α=0.05), seguido de comparaciones múltiples evaluadas con el test de la menor diferencia significativa (Statgraphic Plus para Windows, versión 5.0, 2001, Manugistic Inc., E.E.U.U.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades mecánicas de las películas compuestas

El ensayo de tensión uniaxial hasta fractura de las películas compuestas equilibradas a 57,7% de HR (**Figura 1A, B**), demostró que el esfuerzo de elongación a ruptura (**Ec. 2**) de las películas con 8% de FIA fue significativamente ($p<0,05$) menor que el determinado para las películas con 0% FIA. Mientras que en cuanto a la elongación a ruptura (**Ec. 3**), ésta fue del ≈ 9% para ambos casos (**Figura 1A**), sin diferencias significativas entre los sistemas. Por lo tanto, puede inferirse que el grado de plastificación producido tanto por el glicerol como por el agua adsorbida en la matriz polimérica de las películas, pareciera ser similar en relación a su resistencia tensil en ambas películas (0% y 8% de FIA), a pesar de que la proporción de glicerol fue calculada en base a la PBM.

En un trabajo publicado por Abdollahi et al. (2013), se desarrollaron películas de alginato por recubrimiento (25% de glicerol, en base polimérica), reforzadas con nanotubos de celulosa. La resistencia tensil a ruptura en ese caso, aumentó desde 18 MPa para películas con 0% de celulosa, a 22MPa para películas con un 5% de celulosa, disminuyendo luego a 18 MPa para una concentración de 10% de nanotubos de celulosa. Por otro lado, para la elongación a ruptura, ésta disminuyó desde un 12% a un 8% con el agregado de partículas de nanocelulosa en una concentración de 0% a 5%, pero aumentó su valor a un 10%, para aquellas películas con una concentración de nanotubos de celulosa mayor al 10%.

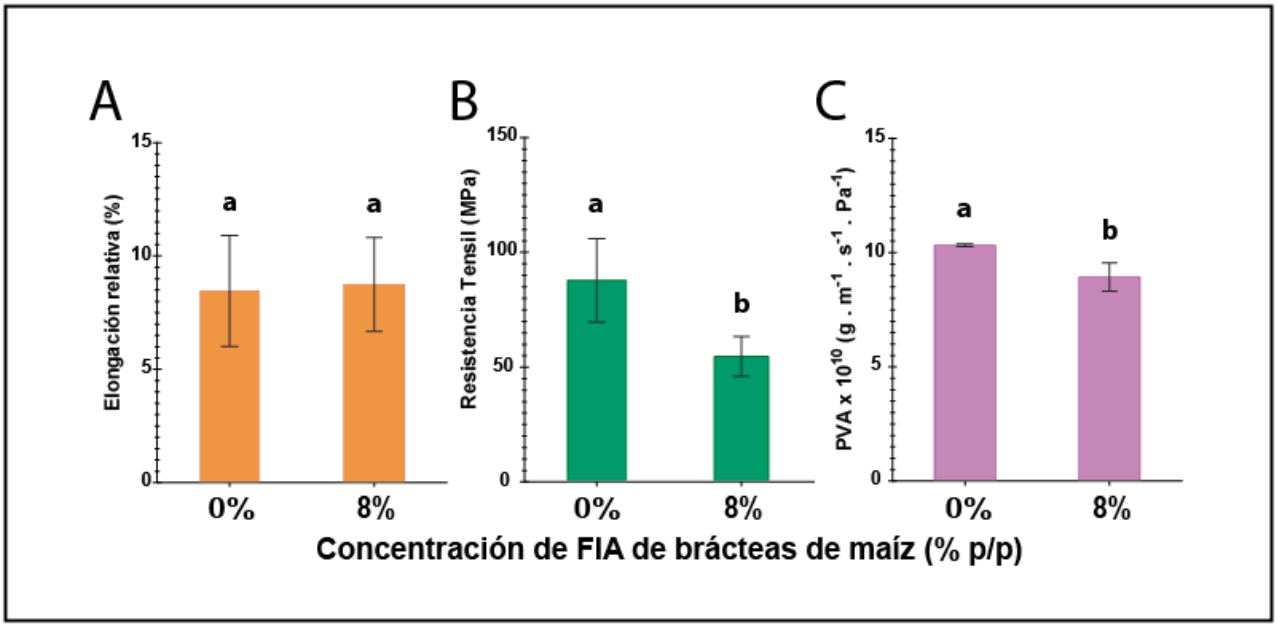
Asimismo, puede concluirse que los valores de resistencia calculados (**Figura 1B**) se relacionan directamente con los valores correspondientes al esfuerzo a ruptura registrados.

Para las películas compuestas con 8% de FIA desarrolladas en el presente trabajo, el descenso del esfuerzo a ruptura y, por lo tanto, de su resistencia tensil (**Figura 1B**), podría estar indicando que las partículas de fibra no se hayan distribuido uniformemente entre las cadenas poliméricas de la matriz de pectina al momento de elaborar las películas probablemente debido al fenómeno de agregación de las partículas de FIA. Las zonas de agregación de partículas, que se comportan como focos de fragilidad en la matriz de PBM, disminuirían así la resistencia de la película compuesta.

Permeabilidad al vapor del agua (PVA)

Más allá del comportamiento mecánico observado, el agregado de un 8% de FIA a las películas demostró un descenso significativo ($p<0,05$) de la PVA en comparación con las películas con 0% de FIA. La permeabilidad al vapor de agua se evaluó a 25°C, bajo convección, con un gradiente de HR de 0%/70%, aplicando para los cálculos la corrección de Gennadios et al. (1994) (**Fig. 1C**). De aquí se desprende que las partículas de fibra insoluble de 53µm pueden estar actuando como relleno que obstaculiza la difusión del vapor de agua a través de la matriz compuesta. A su vez, probablemente también puedan producir una disminución de la capacidad de absorción de agua de la matriz de PBM, al disminuir la solubilidad del vapor de agua en la misma. De acuerdo a Spence et al. (2011), el aumento del grado de cristalinidad en una muestra, como en el caso de las películas compuestas con un 32% de cristalinidad, reduce la PVA.

Figura 1. Resistencia tensil (**A**) y elongación relativa a ruptura de las películas (**B**), permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas (**C**), en función de la concentración de fibra insoluble en agua obtenida de las brácteas del maíz. Las barras de error indican la desviación estándar (*n*=14 para los ensayos de esfuerzo mecánico; *n*=3 para PVA). Letras iguales asignadas para un mismo parámetro significa que no hay diferencias significativas ($p<0.05$).



CONCLUSIONES

La fibra insoluble en agua extraída de las brácteas del maíz (*Zea mays*), residuo vegetal de la industria y la agricultura, con un tamaño de partícula promedio de 53 µm, al ser utilizada como relleno o carga a una concentración del 8% p/p para la fabricación de películas compuestas de pectina de bajo metoxilo, disminuye la PVA mientras que simultáneamente modifica las propiedades mecánicas de las películas, sin alterar significativamente su elongación relativa.

BIBLIOGRAFIA

Abdollahi M, Alboofetileh M, Rezaei M, Behrooz R. 2013. Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. Food Hydrocolloids, 32: 416-424.

Andrade RMS, Ferreira MSL, Gonçalves ECBA. 2016. Development and characterization of edible films based on fruit and vegetable residues. Journal of Food Science, 81(2): E412-E418.

De'Nobili MD, Pérez CD, Navarro DA, Stortz CA, Rojas AM. 2013. Hydrolytic stability of L-(+)-ascorbic acid in low methoxyl pectin films with potential antioxidant activity at food interfaces. Food and Bioprocess Technology, 6: 186-197.

Dhugga KS. 2007. Maize biomass yield and composition for biofuels. Crop Science, 47: 2211-2227.

Galanakis CM. 2013. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. Food and Bioproducts Processing, 91: 575-579.

Gennadios A, Weller CL, Gooding CH. 1994. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. Journal of Food Engineering, 21: 395-409.

Huq T, Salmieri S, Khan A, Khan RA, Le Tien C, Riedl et al. 2012. Nanocrystalline cellulose (NCC)

reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film. Carbohydrate Polymers, 90: 1757-1763.
Shekarabi AS, Oromiehie AR, Vaziri V, Ardjmand M, Safekordi AA. 2014. Investigation of the effect of nanoclay on the properties of quince seed mucilage edible films. Food Science & Nutrition, 2(6): 821-827.
Spence KL, Venditti RA, Rojas OJ, Pawlak JJ, Hubbe MA. 2011. Water vapor barrier properties of coated and filled microfibrillated cellulose composite films. BioResources, 6(4): 4370-4388.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires [números de subvención 2014-2017 20020130100553BA], el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) [números de subvención 2012-2014 PIP 112-201101-00349] y ANPCyT [números de subvención 2014-2017 PICT 2013-2088]. Se agradece a Carlos Rozas (INTI-Celulosa y Papel, Buenos Aires, Argentina.

Brácteas de *Zea mays* como fuente de fibras útiles para el desarrollo de aditivos alimentarios y de materiales

Bernhardt D.C.[1, 3], Ponce N.M.A.[2, 3], Fissore E.N.[1, 3], Stortz C.A.[2, 3], Rojas A.M.[1, 3]

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
(2) Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
(3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.
dana@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se obtuvo **fibra insoluble en agua (FIA)** de brácteas de *Zea mays*, para caracterizarla fisicoquímicamente y predecir su utilidad como aditivo alimentario.
La FIA se trató con etanol, lográndose el **residuo insoluble en alcohol** (**RIA**), constituido por polímeros de pared celular. Tras su extracción secuencial con soluciones acuosas de CDTA, Na_2CO_3, KOH, se determinó el contenido y composición en **azúcares neutros (AN)** y **ácidos urónicos (AU)** de cada fracción. Se obtuvo el espectro FTIR, el patrón de difracción de rayos X del polvo de brácteas y se realizó el análisis termogravimétrico de la fibra total, FIA y RIA.
El RIA presentó un alto porcentaje de AN y una baja proporción de pectinas extraíbles con CDTA y con Na_2CO_3. Ambas pectinas mostraron bajos porcentajes de AU y una importante proporción de arabinosa y xilosa. La solución de KOH 4% disolvió la mayor proporción de hemicelulosa. El espectro FTIR arrojó las señales típicas de arabinoxilanos, residuos de AU esterificados y celulosa. El análisis de rayos X mostró un grado de cristalinidad de 31,7%. En cuanto al análisis termogravimétrico, el comienzo de la descomposición térmica aumentó significativamente conforme el material se concentraba en polímeros de pared celular.

Palabras clave: residuos de maíz, fibra, arabinoxilanos, celulosa, aditivo alimentario.

ABSTRACT

In order to determine its utility as a food additive, the **water insoluble fraction (WIF)** of husks of maize (*Zea mays*) was obtained and submitted to the physicochemical analysis of its properties. WIF was submitted to ethanol treatment, for obtaining the **alcohol insoluble residue (AIR)** constituted by cell wall polymers. AIR was analysed by sequential extraction with aqueous solutions of CDTA, Na_2CO_3, KOH. The content and composition of **neutral sugars (NS)** of each fraction were determined, as well as their content in **uronic acids (UA)**. FTIR spectrum and X-ray diffraction pattern were obtained from the husks powder, whereas thermogravimetric analysis was performed on the husk powder, WIF and AIR.
AIR showed low levels of pectin and a high percentage of NS extractable with CDTA and Na_2CO_3. In both cases, low percentages of UA and an important proportion of arabinose and xylose were observed. 4% KOH solution was able to extract the highest proportion of hemicellulose.
FTIR spectrum showed the typical signals for arabinoxylans, esterified UA residues and cellulose, meanwhile the X-ray assay determined a crystallinity degree of 31.7%. As to the thermogravimetric analysis, thermal decomposition onset increased significantly with the enrichment in cell wall polymers.

Keywords: corn husk discards fiber, arabynoxylans, cellulose, food additives

INTRODUCCION

El maíz, *Zea mays* L., de la familia *Poaceae*, es una planta monocotiledónea de suma importancia en la

economía moderna, ya que sumado a su uso directo como alimento, es utilizado como material crudo en diferentes industrias (desarrollo de aceite, almidón, etanol, biodiesel, etc.) (Gibson y Benson 2002). En ese marco, Argentina es un importante productor y exportador de maíz (en 2013 aprox. 32 millones de toneladas).

Tras la remoción de los granos se genera una gran cantidad de residuos, como ser tallos, hojas, mazorca y brácteas de tejidos que permanecen en el campo y se descomponen, contribuyendo así a la materia orgánica del suelo (Dhugga 2007). Los restos del maíz presentan dos importantes problemáticas, gran volumen de desechos y contaminación ambiental, resultando a su vez en una gran pérdida de materiales nutricionalmente valorables.

Las brácteas de maíz han sido investigadas por la industria papelera, para la producción de papel. Debido a su contenido de fibras de celulosa, se las considera como una potencial fuente de pulpa, la cual requeriría tratamientos de degradación de menor impacto ambiental que aquellos empleados para la obtención de pulpa a partir de madera (Fagbemigun et al. 2014).

Los productos ricos en fibra, como en el caso de las brácteas de maíz, pueden ser utilizados como fuente de aditivos e ingredientes para alimentos funcionales (de Escalada Pla et al. 2013; Kohajdová et al. 2012) y también como fibra dietaria (Basanta et al. 2014), pudiendo ser incorporados a productos alimenticios como agentes de relleno de bajas calorías y de bajo costo, para sustitución parcial de harinas, grasas o azúcar.

En el presente trabajo se realizaron análisis químicos y fisicoquímicos de brácteas de maíz, y de los polisacáridos de pared celular con el objetivo de determinar su grado de cristalinidad, estabilidad térmica, contenido de polímeros y componentes bioactivos para poder desarrollar luego las técnicas adecuadas para extraer dichos componentes a los fines de desarrollar aditivos y/o ingredientes de utilidad en alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la muestra

Las brácteas de maíz (*Zea mays L.*) fueron recolectadas de verdulerías locales que acostumbran desecharlas como residuos. Se secaron a 65ºC por 4h en estufa con convección de aire hasta lograr un secado completo, obteniéndose así un material de textura quebradiza. Luego, se cortaron transversalmente en tiras de 15 mm- de ancho y se molieron empleando un molino de corte de alto rendimiento (SM 300, Retsch, Alemania), con un tamiz de malla de500 µm. El polvo resultante fue fraccionado según su distribución de tamaño de partícula. Para ello, se utilizó una serie de tamices vibratorios (Retsch, Alemania), con mallas ASTM de 840, 420, 210, 105, 53, 25 µm y los polvos obtenidos se almacenaron al vacío en bolsas herméticamente selladas.

Una alícuota de polvo de brácteas (210 µm) se extrajo con agua desionizada (1:1000, p/v) a temperatura ambiente por 24h bajo agitación magnética, se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio (Whatman GF/C, RU) y se enjuagó con agua. El residuo una vez liofilizado, conformó la fracción de **fibra insoluble en agua (FIA)**.

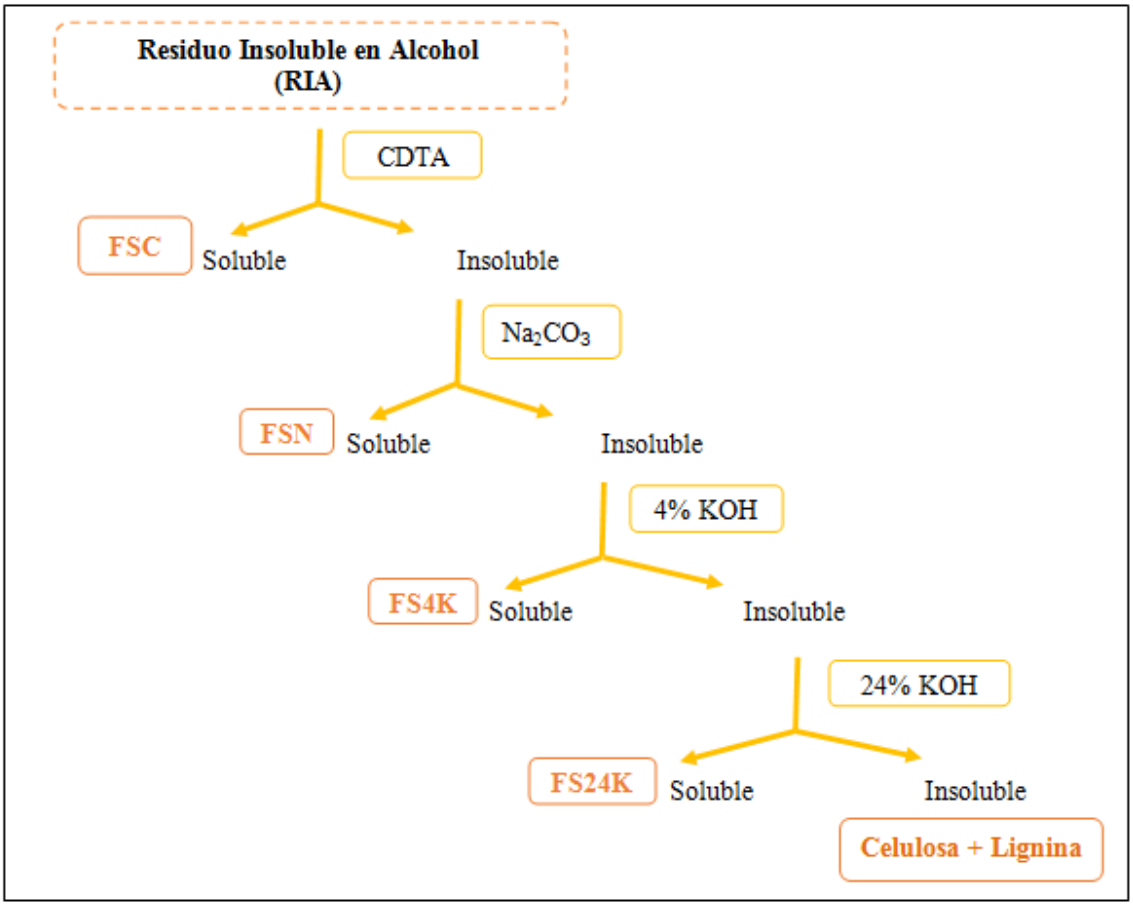
Se extrajeron los biopolímeros de pared celular de la FIA, empleando etanol (85% v/v) en ebullición (100:350 p/v) durante 30 min con agitación y bajo campana de extracción. La suspensión fue luego filtrada (Whatman GF/C, RU) y el residuo se lavó tres veces con etanol en ebullición al 95%. El residuo final se colocó bajo campana de extracción por 18-24hs para la evaporación total del etanol. Finalmente, fue congelado y liofilizado, obteniendo así el **residuo insoluble en alcohol (RIA)**, constituido por el material de la pared celular.

Extracción secuencial de los polímeros de la pared celular

El fraccionamiento de los polímeros de pared celular se llevó a cabo mediante la extracción secuencial del RIA (**Figura 1**), según Basanta et al. (2013). Brevemente, 2 g de RIA se colocaron consecutivamente bajo agitación durante 24h cada vez, con soluciones acuosas de CDTA 0,05 M (pH 6.0), Na_2CO_3 0,1 M, KOH 4% y KOH 24%, obteniéndose las fracciones solubles en **CDTA (FSC)**, **Na_2CO_3 (FSN)** y las de **KOH 4%** y **24% (FS4K y FS24K,** respectivamente) (**Figura 1**). Los extractos y residuos resultantes fueron liofilizados posteriormente a ser neutralizados con ácido acético glacial, lavados y dializados. Se determinó colorimétricamente el contenido de **ácidos urónicos (AU)**, y el contenido y composición de **azúcares**

neutros (AN), por triplicado para cada fracción (Basanta et al. 2013). Para esto último, los polisacáridos presentes en las distintas fracciones se debieron hidrolizar empleando CF_3COOH 2 M (90 min; 120ºC). Luego, los hidrolizados fueron derivatizados a acetatos de alditoles o aldonitrilos, para ser posteriormente analizados por cromatografía gaseosa (GC), usando una columna capilar de (30 m × 0,25 mm) revestida con SP-2330 (0,20 µm) en un cromatógrafo gaseoso HP-5890 equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó nitrógeno como fase móvil (gas carrier), con una velocidad de flujo de 1ml/min y una relación de split 90:1. Las corridas cromatográficas se realizaron bajo isoterma a 220ºC, mientras que el inyector y detector se setearon a 240ºC. Como estándar interno se utilizó Myo-inositol para los acetatos de alditoles, y D-lixosa para los acetatos de aldonitrilos. Cuando fue necesario la identificación, se realizó el análisis de CG-MS en un equipo Shimadzu QP 5050 A CG/MS, trabajando a 70eV, empleando condiciones similares a las descriptas anteriormente, pero utilizando He como gas carrier con una relación de Split 60:1.

Figura 1. Esquema de la extracción secuencial de los polímeros de pared celular, realizada sobre el residuo insoluble en alcohol (RIA), de las fibras de las brácteas de maíz.



Análisis de FTIR

Las determinaciones fueron realizadas en un espectrofotómetro de Espectro BX FT-IR (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.). Se analizó el polvo de brácteas total, empleando una pastilla de KBr (1% p/p). Se trabajó en el rango de 4500-525 cm^{-1}, realizando 64 barridos de transmitancia por espectro, con una resolución de 4 cm^{-1}. La adquisición de los espectros y su procesado se efectuó mediante el software Perkin Elmer Spectrum One Procedures Software (Microsoft® Visual Basic 4.0, Massachusetts, EE.UU.).

Difracción de rayos X

Las muestras de brácteas molidas se irradiaron con rayos X empleando un difractómetro Philips (PW 1510,

Países Bajos) dotado de un goniómetro que opera a Cu K α radiación λ= 1.542 Å, 40 kV y 30 mA. La intensidad de los rayos X se registró con un contador de centelleo en un ángulo de dispersión (2θ) de rango 6-33º (1º/min). Las distancias entre los planos de los cristales *d* (Å) se calcularon a partir de los ángulos de difracción (º) obtenidos del patrón de rayos X, de acuerdo a la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin(\theta) \quad (1)$$

Donde λ es la longitud de onda del haz de rayos X y *n* es el orden de reflexión, considerado como 1 para los cálculos.

Análisis termogravimétrico (TGA)

La descomposición térmica de las tres muestras de polvos se evaluó mediante un analizador térmico simultáneo (TG-DSC/DTA TA Instrumentos SDT Q600, EE.UU.), equipado con un sistema de flujo de nitrógeno y un sistema de adquisición de datos. Cada muestra (≈10 mg), colocada en un plato de aluminio, fue tratada térmicamente a una velocidad de calentamiento de 10ºC/min bajo N_2 (100 mL/min) desde temperatura ambiente hasta los 600ºC. La pérdida de masa y los cambios caloríficos fueron apuntados en función de la temperatura, éstos se usaron luego para graficar TG y las derivadas de las **curvas termogravimétricas (DTG).** Las experiencias se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados fueron informados como la desviación media y estándar para *n* replicados de cada muestra, después de un análisis por ANOVA (nivel de significancia, α=0,05), seguido de comparaciones múltiples evaluadas a través de la prueba de la menor diferencia significativa (Statgraphic Plus para Windows, versión 5.0, 2001, Manugistic Inc., Rockville, MD, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción secuencial de los polímeros de la pared celular (RIA)

Las propiedades funcionales de las fibras se relacionan primordialmente con su composición polimérica, así como también con los compuestos bioactivos presentes en la fuente vegetal originaria (Basanta et al. 2014, de Escalada Pla et al. 2013). Mediante la extracción secuencial del material de pared celular aislado de las brácteas de maíz (**Figura 1**) es posible identificar los entrecruzamientos poliméricos presentes y de esta manera, elucidar qué tipo de polímeros provee la cáscara del maíz (Fry 1986). Consecuentemente, se podrán proponer técnicas para la extracción y aplicación de dichos polímeros en trabajos futuros.

Considerando los rendimientos expresados en la **Figura 2A**, los componentes menos significativos encontrados en el material de la pared celular, resultaron ser pectinas (FSC y FSN) y aquellas hemicelulosas que interactúan fuertemente con la celulosa, a través de uniones puente de hidrógeno (FS24K) (Fry 1986).

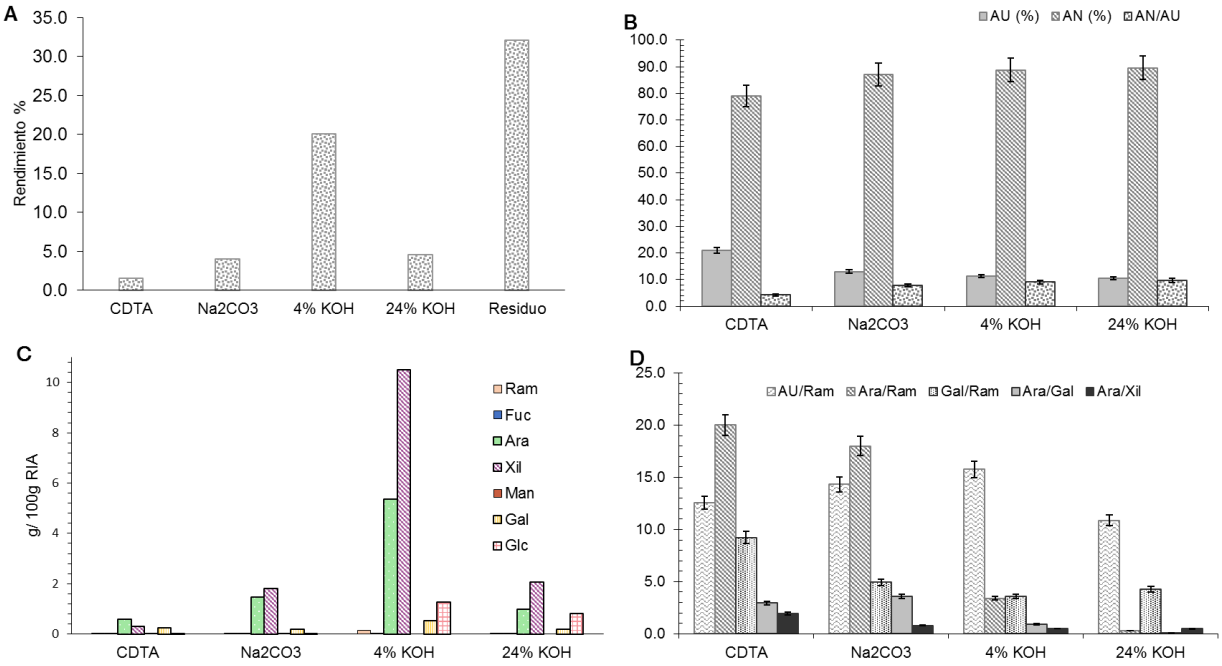
Teniendo en cuenta que los AU forman parte de las cadenas de **homogalacturonanos** (**HG**) de las pectinas, en la **Figura 2B** puede apreciarse que las pectinas entrecruzadas con calcio (FSC) y covalentemente (FSN) (Fry 1986), estaban constituidas por 21% y 13% de AU, respectivamente. Tras detectar un elevado nivel de AN (79 y 87%; **Figura 2B**) en ambas fracciones extraídas, fue posible calcular las relaciones molares AN/AU de 4,2 y 7,8 (**Figura 2B**), siendo notablemente más elevadas que aquellas correspondientes usualmente a pectinas (≈1-2) (Basanta et al. 2013). De aquí se desprende que el contenido de AN no puede deberse únicamente a las pectinas, sino que también puede proceder de **arabinoxilanos (AX)** solubles, dado que el valor más elevado de AN corresponde a arabinosa (Ara) y xilosa (Xil) (**Figura 2C**). Se calculó la relación molar Ara/Xil para FSC y FSN, dando 1,8 y 0,7-0,8 respectivamente (**Figura 2D**). En las monocotiledóneas (pastos y algunas especies relacionadas con el maíz), los xilanos son los polisacáridos no celulósicos mayoritarios dentro de las pared celular primaria, constituyendo aproximadamente el 20% del total de polisacáridos. Generalmente, los xilanos contienen residuos principalmente de arabinosa, unidos a su cadena principal, por esa razón son conocidos como arabinoxilanos (Scheller y Ulvskov 2010).

El residuo de celulosa y lignina (**Figura 1**) es uno de los dos componentes principales de la pared celular de

las brácteas del maíz (**Figura 2A**), a pesar de que la celulosa fue específicamente el polímero más abundante en este residuo. El segundo componente mayoritario es la hemicelulosa menos retenida por la celulosa (FS4K) (**Figura 1**). Esta fracción contiene los valores más altos de Xil y Ara (**Figura 2C**) contribuyendo a los AN (**Figura 2B**) y comprende a los arabinoxilanos insolubles, con una sustitución de Ara baja (Ara/Xil; **Figura 2D**). Se apreció solo una baja proporción de hemicelulosa fuertemente unida a la celulosa (FS24K, **Figura 1**) de las fibras de brácteas molidas, siendo también arabinoxilanos insolubles (**Figura 2C**), con baja sustitución de Ara (**Figura 2D**). Según Ebringerová et al. (2005), el grado de sustitución de los xilanos por Ara afecta la solubilidad de los arabinoxilanos. Teniendo en cuenta tanto el proceso de aislamiento y fraccionamiento, como la distribución y grado de sustitución por los residuos de Ara, los AX pueden clasificarse en dos o tres grupos. El primer grupo incluye aquellos AX solubles en agua, monosustituidos (Ara/Xil hasta 0,2-0,3), similar a la relación hallada en la solución de la FS4K, con restos de α-L-Ara*f* unidos mayormente en la posición 3 de la cadena principal de xilanos. El segundo y tercer grupo comprenden los xilanos solubles en agua con una relación Ara/Xil entre 0,3 y 1,2. Los arabinoxilanos del segundo grupo poseen una relación Ara/Xil intermedia (0,5-0,9), y poseen secuencias más cortas de residuos de Xil*p* disustituidos, que el tercer grupo.

En cuanto al mejoramiento de las propiedades de panificados, los arabinoxilanos extraíbles con soluciones alcalinas son de gran interés, puesto que logran efectos similares o incluso mayores que los AX extraíbles con agua, durante el proceso de horneado de las harinas de cereales.

Figura 2. Extracción secuencial de los polisacáridos de las brácteas de maíz. Rendimiento de cada fracción obtenida luego de ser tratada con CDTA, carbonato de sodio e hidróxido de potasio (**A**); se muestra la composición de polisacáridos de cada fracción extraída expresada como ácidos urónicos (AU), azúcares neutros (AN) (**B**);contenido de AN tales como ramnosa (Ram), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xil), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc), de las distintas fracciones aisladas de las paredes celulares, expresados cada 100g de RIA (**C**), y la relación molar calculada entre los diferentes AN componentes (**D**).



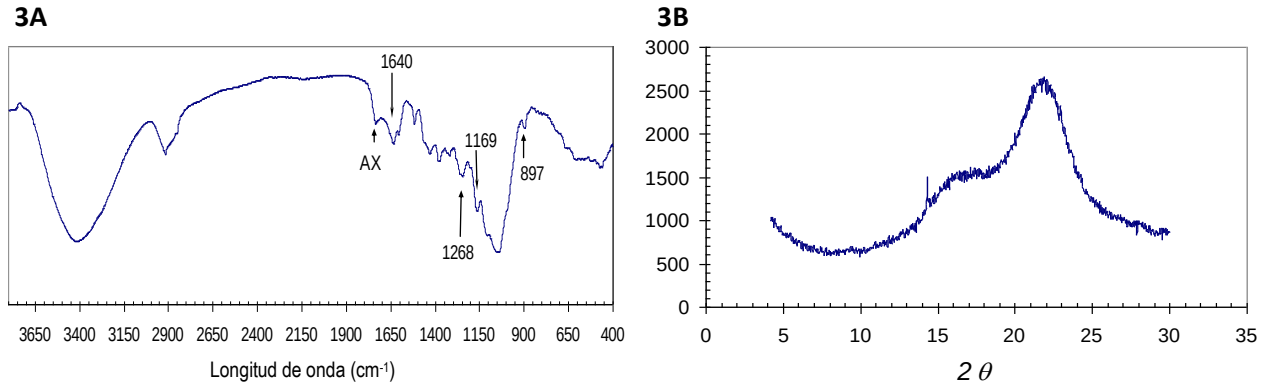
Análisis FTIR

El espectro de FTIR adquirido a partir de las brácteas molidas mostró señales en longitudes de onda

típicamente correspondientes a hemicelulosas (**Figura 3A**). Una banda ancha típica encontrada a ≈ 3440 cm^{-1}, puede atribuirse principalmente a uniones del tipo puente de hidrógeno intra e intermoleculares de las hemicelulosas (Fang et al. 2000). Más rigurosamente, puede tratarse de arabinoxilanos (Morales-Ortega et al. 2013), dado a que la señal cae a una longitud de onda mayor que aquellas donde suelen caen las señales para pectinas. Por otro lado, se pudo apreciar una banda ancha más corta a 2925 cm^{-1}, correspondiente al estiramiento del OH de los grupos carboxilos presentes en las pectinas, más específicamente, en los residuos glucurónicos de los (glucuro) arabinoxilanos (**Figura 3A**). Ésta última señal se visualizó acompañada por un pico muy pequeño a 2867 cm^{-1}, que puede asignarse a los grupos $–CH_2$ (Morales-Ortega et al. 2013). Por todo eso, es posible afirmar que se trata de señales típicas para hermicelulosas, según lo reportado por Fang et al. (2000).

También se pudo apreciar en el espectro adquirido para el polvo de brácteas, una banda situada a 1739-1619 cm^{-1} con tres picos pequeños pero distinguibles (**Figura 3A**). El primer pico a 1739 cm^{-1} puede atribuirse a las vibraciones moleculares de los grupos carbonilos esterificados, debidos en parte al ácido galacturónico esterificado de las pectinas (Kačuráková et al. 2002) y en parte a la esterificación de los arabinoxilanos con grupos aromáticos tales como el ácido ferúlico (Morales-Ortega et al. 2013). En cuanto al pico encontrado a 1643 cm^{-1}, en el artículo publicado por Fang et al. (2000), reportaron un único pico fuerte a 1640 cm^{-1} para hemicelulosas, asignándolo a la presencia de agua adsorbida. En otro trabajo publicado por Wilson et al. (2000), también fue hallado un pico a 1640 cm^{-1} en un espectro para celulosa y pectinas, el cual pudo asignarse a vibraciones HOH del agua adsorbida. Por último, el pequeño pico a 1619 cm^{-1} puede deberse a los grupos carboxilos de las pectinas, ya que se detectó una pequeña porción de las mismas en el RIA (4%).

Figura 3. Espectro de Transmisión FTIR (A) y patrón de difracción de rayos-X (B) realizados sobre el polvo de brácteas de maíz.



Aquellas bandas visualizadas entre 1125 y 1000 cm^{-1} (**Figura 3A**) corresponden típicamente a xilanos, según lo reportado por Fang et al. (2000). Una banda prominente a 1048 cm^{-1} se atribuye al estiramiento C-O, C-C o doblamientos C-OH de las hemicelulosas (Fang et al. 2000; Kačuráková et al. 2002) y celulosas (Wilson et al. 2000). Dentro de esta banda se incluye un pico a 1169 cm^{-1} (**Figura 3A**), dado por vibraciones C-O-C de los anillos de los residuos de hexosas (uniones glicosidicas) de celulosas (Wilson et al. 2000) y hemicelulosas (Fang et al. 2000; Kačuráková et al. 2002).

Finalmente, un pico agudo observado a 897 cm^{-1} en el espectro FTIR , correspondiente a las frecuencias tanto de grupos Cl como de anillos, es característico de las uniones β-glicosidicas entre las unidades de azúcares de las celulosas (Kačuráková et al. 2002) y hemicelulosas (Fang et al. 2000a).

Difracción de rayos X

El patrón de difracción de rayos X realizado sobre el polvo de brácteas de maíz (**Figura 3A**), muestra un perfil amorfo con una señal de $2\theta \approx 22.095$ (*d* distancia, ≈ 4.02 Å; eq. 1) correspondiente principalmente a celulosa, y otra a $2\theta \approx 14.325$ (señal aguda; *d* distancia, ≈ 6.18 Å), ambas señales acompañadas por una

región amorfa de xilanos y celulosa entre los valores 10 y 18 de 2θ (Uhlin 1990). Se calculó un grado de cristalinidad de 31,7 %, de acuerdo con Xiao et al. (2011). Las regiones cristalinas son atribuibles a uniones, debidamente ordenadas, entre los polisacáridos que componen las fibras de las brácteas de maíz (**Figura 2B**). Los procedimientos para la extracción de la celulosa, pueden alterar su grado de cristalinidad, mientras que la presencia de hemicelulosa, puede modificar el patrón de cristalinidad desde I_α en celulosa de origen bacteriano, a I_β hallado en plantas superiores (Uhlin et al. 1995). Otros autores como Guillon et al. (1989), proponen que en el azúcar de fibra de remolacha, la degradación de la misma decrece conforme aumenta la porción de celulosa cristalina, durante el proceso de fermentación de microflora compleja. Sugiriendo que la fermentación de la celulosa en humanos, se encuentra limitada por el grado de cristalinidad de la misma.

Análisis Termogravimétrico (TGA)

Al comparar el polvo de brácteas total con la FIA y el RIA, se obtuvieron diferentes perfiles termogravimétricos. El comienzo de la descomposición térmica se vio aumentado significativamente conforme la muestra se enriquecía en polímeros de pared celular (RIA), seguido de una disminución de la pérdida de peso (**Tabla 1**). En el DTG del polvo de brácteas se pudieron apreciar tres picos a lo largo del tiempo. Tanto el primer pico (que fue el más pequeño), a los 211ºC, como el segundo pico a los 280ºC (**Tabla 1**), pueden corresponder a la degradación de las sustancias solubles en agua (azúcares reductores y proteínas), incluyendo la eliminación de moléculas de agua. Por otro lado, las fibras insolubles y el RIA presentaron solo dos puntos de inflexión, con mayores temperaturas de degradación y pérdidas de peso que la muestra anterior (**Tabla 1**).

Tabla 1. Análisis Termogravimétrico de los polvos de brácteas de maíz (10ºC/min). La pérdida de masa se ha expresado entre paréntesis.

	Polvo de brácteas de maíz	Fibra insoluble en agua	Material de pared cellular (RIA)
Comienzo del 1er pico (C)	**184º (6,37%)**	**197º (3,52%)**	**227º (3,93%)**
1er pico (C)	**211º (12,8%)**	**304º (26,99%)**	**300º (25,48%)**
Fin del 1er pico (C)	**235º (17,66%)**	**329º (39,15%)**	**322º (37,69%)**
2do pico (C)	**280º (31,42%)**	**352º (52,97%)**	**344º (51,3%)**
Fin del 2do pico (C)	**305º (40,56%)**	**393º (65,08%)**	**389º (63,43%)**
3er pico (C)	**331º (52,86%)**	—	—
Fin 3er pico (C)	**397º (65,38%)**	—	—

En el caso de la paja del trigo, la fracción de hemicelulosa comprende aproximadamente el 75% del material deslignizado (Fang et al. 2000). Dicha fracción constituida principalmente por arabinoxilanos, y en menor proporción por lignina residual. La degradación de este material comenzó a los 220ºC y se completó a los 395ºC aproximadamente. En el presente trabajo, la fracción insoluble y el material de pared celular de las brácteas de maíz alcanzaron su máxima temperatura de degradación por encima de los 320ºC (**Tabla 1**), a pesar de que la lignina presente haya posiblemente continuado su descomposición más allá de esa temperatura. Por otro lado, para la celulosa en su forma cristalina, se ha reportado el comienzo de su descomposición a los ≈315ºC, mientras que el máximo de descomposición observado en el DTG fue a los 370ºC, según Huang (2012).

CONCLUSIONES

El polvo de brácteas molido, con un 31,7% de cristalinidad, mostró una temperatura inicial de descomposición que aumenta a medida que se incrementa su concentración en polímeros de la pared celular. Por lo tanto, es posible desarrollar productos a partir de la fibra insoluble en agua, constituida principalmente por arabinoxilanos y celulosa, con un contenido mínimo de lignina, sin la necesidad de tratamientos para su deslignización y empleándola como fuente de AX. Se propone entonces, la posible aplicación de este subproducto en la producción de oligosacáridos y como aditivo de alimentos tales como productos panificados.

BIBLIOGRAFIA

Basanta MF, de Escalada Pla MF, Stortz CA, Rojas A M. 2013. Chemical and functional properties of cell wall polymers from two cherry varieties at two developmental stages. Carbohydrate Polymers, 92: 830-841.
Basanta M F, de Escalada Pla M F, Raffo MD, Stortz CA, Rojas AM. 2014. Cherry fibers isolated from

harvest residues as valuable dietary fiber and functional food ingredients. Journal of Food Engineering, 126: 149-155.
de Escalada Pla MF, Rojas AM, Gerschenson LN. 2013. Effect of butternut (*Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret*) fibres on bread-making, quality and staling. Food and Bioprocess Technology, 6: 828-838.
Dhugga KS. 2007. Maize biomass yield and composition for biofuels. Crop Science, 47: 2211-2227.
Ebringerová A, Hromádková Z, Heinze T. 2005. Hemicellulose. Advances in Polymer Science, 186: 1-67.
Fagbemigun T K., Fagbemi O D, Otitoju O, Mgbachiuzor E, Igwe CC. 2014. Pulp and paper-making potential of corn husk. International Journal of Agricultural Sciences, 4(4): 209-213.
Fang JM, Sun RC, Tomkinson J. 2000a. Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction. Cellulose, 7*:* 87-107.
Fang JM, Sun RC, Tomkinson J, Fowler P. 2000. Acetylation of wheat straw hemicellulose B in a new non-aqueous swelling system. Carbohydr. Polymers, 41: 379-387.
Fry SC. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annual Review of Plant Physiology, 37: 165-186.
Gibson L, Benson G. 2002. Origin, history, and uses of corn (*Zea mays*). En: http://agron-www.agron.iastate.edu/Courses/agron212/readings/corn_history.htm
Guillon F, Thibault JF, Romboust FM, Voragen AGJ, Pilnik W. 1989. Enzymatic hydrolysis of the hairy fragments from sugar-beet pectins. Structural investigations of the neutral sugar-side chains of sugar-beet pectins. Part 2. Carbohydrate Research, 190: 97-108.
Huang FY. 2012. Thermal properties and thermal degradation of cellulose tri-stearate (CTs). Polymers, 4: 1012-1024.
Kačuráková M, Smith AC, Gidley MJ, Wilson RH. 2002. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. Carbohydrate Research, 337: 1145–1153.
Kohajdová Z, Karovičová J, Jurasová M. 2012. Influence of carr.ot pomace powder on the rheological characteristics of wheat flour dough and on wheat rolls quality. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 11: 381-387.
Morales-Ortega A, Carvajal-Millan E, López-Franco Y, Rascón-Chu A, Lizardi-Mendoza J, Torres-Chavez P, Campa-Mada A. 2013. Characterization of Water Extractable Arabinoxylans from a Spring Wheat Flour: Rheological Properties and Microstructure. Molecules, 18: 8417-8428.
Scheller HV, Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology, 61: 263-289.
Uhlin KI. 1990. The influence of hemicelluloses on the structure of bacterial cellulose. Doctor's dissertation. The Institute of Paper Science and Technology. Atlanta, Georgia, USA. Available at:Uhlin KI. 1990. The influence of hemicelluloses on the structure of bacterial cellulose. Doctor's dissertation. The Institute of Paper Science and Technology. Atlanta, Georgia, USA. Available at: https://smartech.gatech.edu/bitstream/handle/1853/5454/uhlin_ki.pdf;jsessionid=89FDAA851DB4949FF8438445339B5E4C.smart1?sequence=1
Uhlin KI, Atalla RH, Thompson RS. 1995. Influence of hemicelluloses on the aggregation patterns of bacterial cellulose. Cellulose, 2: 129-144.
Wilson RH, Smith AC; Kačuráková M, Saunders PK; Wellner N, Waldron KW. 2000. The Mechanical Properties and Molecular Dynamics of Plant Cell Wall Polysaccharides Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. Plant Physiology, 124: 397–405.
Xiao LP, Sun ZJ, Shi ZJ, Xu F, Sun RC. 2011. Impact of hot compressed water pretreatment on the structural changes of woody biomass for bioethanol production. BioResources, 6(2): 1576-1598.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires (UBA), al y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT) el consentimiento de este proyecto. N.M.A.P., C.A.S., y A.M.R. son Miembros Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones

Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

Estabilidad oxidativa de *blends* de aceite de chía

Bordón M.G.[1,2,3], Barrionuevo D.[4], Marín M.A.[2,3], Ribotta P.D.[1,2,3], Martínez M.L.[2,3,4]

(1) Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAC – CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
(2) Departamento de Química Industrial y Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
(3) Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
(4) Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
gabrielabordon90@gmail.com

RESUMEN

Las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) contienen entre un 32 y 39% de aceite, que está constituido principalmente por ácidos grasos ω-3 (61-70 %). Si bien una mayor proporción de estos ácidos grasos resulta favorable desde el punto de vista nutricional, se traduce en un aceite de menor estabilidad oxidativa. Una alternativa tecnológica para prolongar su vida útil es la formulación de *blends* con aceites con una composición lipídica más estable. El objetivo de este trabajo fue estudiar la estabilidad oxidativa de las siguientes mezclas: chía:nuez (C:N), chía:almendra (C:A), chía:sésamo virgen (C:SV) y chía:sésamo tostado (C:ST) en distintas proporciones (40:60, 30:70 y 20:80). Las muestras fueron sometidas a un ensayo de termooxidación (*Schaal Oven Test*, 40 ± 1°C) durante 12 días en estufa bajo convección forzada de aire. Se determinó índice de peróxido (IP) como indicador de oxidación primaria e índice de acidez (IA) como indicador de daño hidrolítico. Bajo estas condiciones térmicas de ensayo, el tratamiento que presentó la mayor estabilidad oxidativa fue la mezcla C:SV (20:80). Los resultados permiten concluir que la formulación de *blends* con aceites vegetales no tradicionales resulta una alternativa tecnológica adecuada para obtener matrices lipídicas ricas en ω-3 con una estabilidad oxidativa superior al aceite de chía puro.

Palabras Clave: chía, blends, estabilidad oxidativa.

ABSTRACT

Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) contain around 32 and 39% of oil, which is mainly composed by ω-3 fatty acids (61-70 %). Despite being nutritionally favorable, high amounts of polyunsaturated fatty acids result in poorer oxidative stability and shorter shelf life of the oil. Formulation of oil blends with a more stable lipid composition has emerged as an economical way of modifying the physicochemical characteristics of vegetable oils and of enhancing their oxidative stability. Thus, the aim of this work was to assess the oxidative stability of the following oil blends: chia:walnut, chia: almond, chia:sesame, chia:roasted sesame in different proportions (40:60, 30:70 and 20:80). An accelerated storage test (*Schaal Oven Test*) was conducted at 40 ± 1 °C for 12 days in a forced draft oven. Hydroperoxide and acidity values were determined daily. Under the thermooxidation conditions studied, the chia:sesame oil blend (20:80) showed the best oxidative stability. Results from this work suggest that oil blend formulation represents a good technological alternative to obtain oils rich in ω-3 with a higher oxidative stability than chia oil.

Keywords: chia, oil blends, oxidative stability.

INTRODUCCIÓN

El creciente interés de los consumidores en el binomio alimentación-salud ha intensificado la búsqueda de

nuevos hábitos alimenticios para adoptar un estilo de vida sano. Una alimentación rica en ácidos grasos insaturados, ω-3, ω-6 y ω-9, disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer y síndrome metabólico (Rodea-González *et al.* 2012, Umesha *et al.* 2015). Las semillas de chía, con un 32 - 39% de aceite, constituyen la fuente vegetal más rica en ácidos grasos ω-3 (61 - 70%) (Ixtaina *et al.* 2008, 2011, Ayerza y Coates 2004, 2011). Si bien un mayor consumo de los mismos resulta beneficioso desde el punto de vista nutricional y de la salud, se traduce en un aceite de menor estabilidad oxidativa. A su vez, los productos originados a partir de su deterioro se han asociado a desórdenes fisiológicos, tales como envejecimiento, carcinogénesis y arterosclerosis (Ortega-Nieblas *et al.* 2001, Frankel 2005).
La formulación de *blends* de dos o más aceites con características físico-químicas diferentes constituye uno de los métodos más simples para el desarrollo de nuevos productos. Recientemente, se han encontrado numerosas publicaciones que demuestran un creciente interés en esta práctica dentro del sector de la industria aceitera (Hashempour-Baltork *et al.* 2016). No sólo permite modificar el perfil de ácidos grasos, sino también incrementar el nivel de lípidos bioactivos y de antioxidantes naturales en la mezcla final (Li *et al.* 2013, Li *et al.* 2014). En consecuencia, se obtienen aceites con mejor calidad nutricional y estabilidad oxidativa a costos relativamente bajos (Guiotto *et al.* 2014, Kavuncuoglu *et al.* 2016). A la luz de estas nuevas tendencias, el desarrollo de *blends* de aceite de chía con aceites de frutos secos (nuez, almendro) y de algunas semillas oleaginosas no tradicionales (sésamo) ofrece una oportunidad que no ha sido prácticamente explotada.
En función de estas premisas, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad oxidativa de *blends* conformados por aceite de chía y otros aceites vegetales con una composición lipídica más estable (Tabla 1): nuez, almendra y sésamo (virgen y tostado).

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de los aceites de chía, nuez, almendra y sésamo.

Ácidos grasos (%); N.D: no detectado.	**Chía** (Ixtaina *et al*. 2011, Martínez *et al*. 2012)	**Nuez** (Martínez *et al*. 2010)	**Almendra** (Kodad *et al*. 2011, Yada *et al*. 2011, Maestri *et al*. 2015)	**Sésamo** (Kochhar 2002)
Palmítico	6,0-9,0	6,0-8,0	4,0-13,0	7,2-12,0
Esteárico	2,5-5,0	1,0 - 3,0	2,0-5,0	3,5-6,0
Oleico	6,0-9,0	15-28,5	43,0-75,0	35,0-50,0
Linoleico	15,0-21,0	50,0-63,0	16,0-34,0	37,0-48,0
Linolénico	54,0-68,0	9,6-19,0	ND	0,2-1,0

ND: no detectado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de aceites vegetales

Los aceites vegetales fueron extraídos mediante prensa de tornillo helicoidal escala piloto (Komet Modelo CA 59 G) según Martínez *et al.* (2012, 2013a, 2013b) y datos aún no publicados de sésamo.
La extracción de aceite de sésamo tostado se llevó a cabo luego del tratamiento térmico de las semillas en un secador de lecho fluidizado (Sherwood Scientific Ltd) durante 20 minutos, fijando la temperatura de ingreso del aire al secador en 180 ± 5°C.
El extracto obtenido (aceite + sólidos) fue posteriormente centrifugado de acuerdo a la metodología descripta por Martínez *et al.* (2008).

Preparación de blends

Los *blends* fueron preparados a partir de la mezcla de aceite de chía con aceites de nuez, almendra y sésamo (virgen y tostado) en las siguientes proporciones: 20:80, 30:70 y 40:60 (v/v). Las mezclas se agitaron uniformemente durante 5 minutos de acuerdo a la metodología propuesta por Guiotto *et al.* (2014).

Caracterización de aceites

- Índice de peróxidos (IP), como indicador de oxidación primaria, de acuerdo al método Cd 8b-90 de la AOCS (2009).
- Índice de acidez (IA), como indicador de daño hidrolítico, según el método Cd 3d-63 de la AOCS (2009).
- Estabilidad oxidativa (EO): evaluada mediante el método de oxidación acelerada (Cd 12b-92 AOCS, 2009) por Rancimat (Metrohm, Herisau, Suiza) a 100 °C, con flujo de aire de 20 l/h y 3 g de aceite.
- Contenido de lignanos totales en aceite de sésamo (LT): determinado espectrofotométricamente (Perkin-Elmer Lambda 25, Shelton, CT, USA) según Bhatnagar *et al.* (2015), y expresado en equivalentes de sesamol (g/kg de aceite).
- Contenido de tocoferoles totales (TT): según Wong *et al.* (1988).
- Desarrollo de color en aceite de sésamo: se determinó espectrofotométricamente según la metodología propuesta por Yen (1990), de acuerdo a la siguiente fórmula: $77{,}4.\ A_{450} - 31{,}2.\ A_{670}$, donde A_{450} y A_{670} corresponden a las absorbancias de la muestra obtenidas mediante lectura directa a 450 y 670 nm, respectivamente.

Ensayo de termooxidación (Schaal Oven Test)

Los aceites puros, así como sus respectivos *blends*, fueron almacenados en frascos de vidrio color ámbar abiertos durante 12 días a 40 ± 1°C. El ensayo se llevó a cabo en estufa bajo convección forzada de aire, de acuerdo al método Cg 5-97 de la AOCS (2009), tomando en forma diaria dos recipientes de cada tratamiento para análisis.

Análisis Estadístico

La base informática utilizada fue el programa INFOSTAT versión 2011. Los tratamientos fueron realizados por duplicado y las diferencias entre ellos se estimaron mediante análisis de la varianza (ANAVA) y, cuando fuera necesario, un test a posteriori de comparaciones múltiples (Fisher LSD: $p \leq 0{,}05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 2** se presentan los valores iniciales de IP, IA y EO para cada tratamiento.

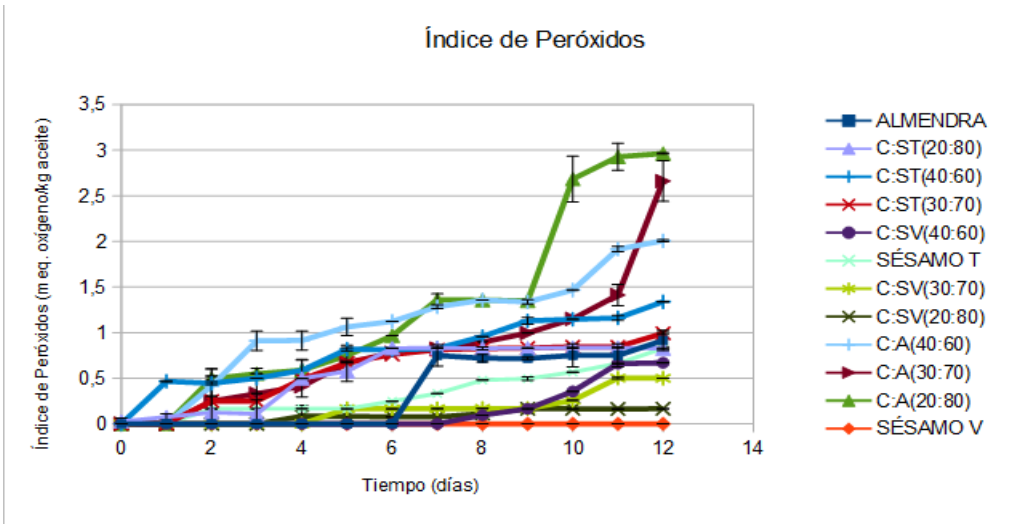
Tabla 2. Valores iniciales de IP, IA y EO de los distintos tratamientos.

Tratamiento[a]	IP[b] (meq oxígeno/kg aceite)	IA[c] (% p/p ácido oleico)	EO[d] (h)
C	0,45 ± 0,07	0,97 ± 0,02	2,56 ± 0,10
A	N.D.	0,06 ± 0,00	27,14 ± 0,43
N	N.D.	0,03 ± 0,00	6,87 ± 0,03
SV	N.D.	2,74 ± 0,01	18,93 ± 0,50
ST	N.D.	2,04 ± 0,01	26,94 ± 0,96
C:A(20:80)	N.D.	0,37 ± 0,01	9,70 ± 0,30
C:A(30:70)	N.D.	0,51 ± 0,03	7,41 ± 0,19
C:A(40:60)	N.D.	0,60 ± 0,01	6,22 ± 0,09
C:N(20:80)	N.D.	0,34 ± 0,02	5,23 ± 0,02
C:N(30:70)	N.D.	0,50 ± 0,01	4,91 ± 0,11
C:N(40:60)	N.D.	0,62 ± 0,01	4,17 ± 0,18
C:SV(20:80)	N.D.	2,49 ± 0,00	10,97 ± 0,33
C:SV(30:70)	N.D.	2,41 ± 0,03	8,86 ± 0,15
C:SV(40:60)	N.D.	1,93 ± 0,04	7,08 ± 0,11
C:ST(20:80)	N.D.	1,95 ± 0,02	12,66 ± 0,18
C:ST(30:70)	N.D.	1,94 ± 0,01	9,19 ± 0,01
C:ST(40:60)	N.D.	1,87 ± 0,02	7,63 ± 0,41

[a]C: chía, A: almendra, N: nuez, SV: sésamo virgen, ST: sésamo tostado; [b]IP: índice de peróxidos; [c]IA: índice de acidez; [d]EO: Estabilidad Oxidativa.

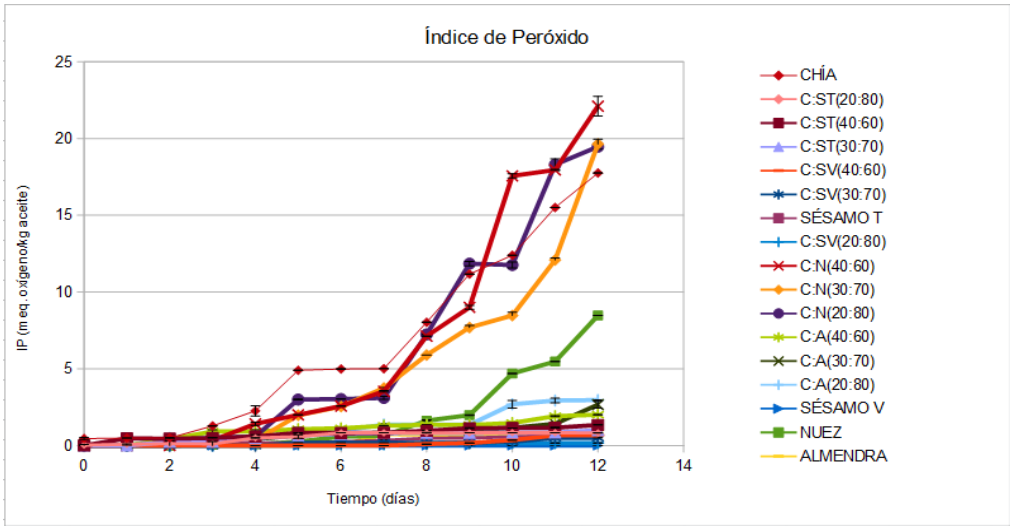
En la **Figura 1** se muestra la evolución de IP para cada uno de los tratamientos, a lo largo de los 12 días de ensayo.

Fig 1. Evolución de IP a lo largo de 12 días de ensayo. **(a).** Todos los tratamientos. **(b).** Valores para A, SV, ST y sus respectivos *blends*. C: chía, A: almendra, N: nuez, SV: sésamo virgen, ST: sésamo tostado.



(a)

(b)



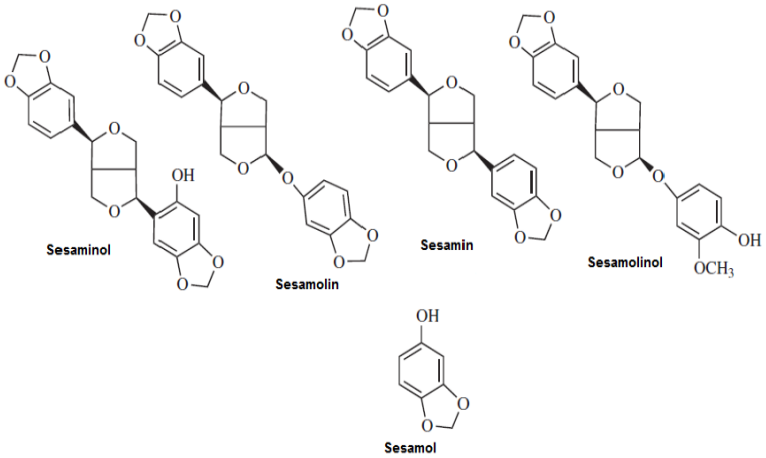
El aceite de chía y sus *blends* con aceite de nuez [C:N (20:80), C:N (30:70), C:N (40:60)] superaron los 10 meq oxígeno/kg aceite entre los días 9 y 11, alcanzando valores finales de IP de 17,75; 19,46; 19,63 y 22,10 meq oxígeno/kg aceite, respectivamente (**Figura 1 a**). Los resultados demuestran que la incorporación de aceite de chía al aceite de nuez en las distintas proporciones estudiadas, aumenta significativamente ($p \leq 0,05$) la producción de compuestos de oxidación primaria a partir del día 4. La falta de estabilidad oxidativa asociada a estos tratamientos resulta consistente con el perfil de ácidos grasos de dichas matrices lipídicas. A medida que crece el número de insaturaciones, se ve afectada la velocidad de oxidación. Según Frankel (2005), a 100ºC las velocidades relativas de oxidación de los ácidos esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) son 1 : 100 : 1000/1500 : 2000/3500, respectivamente.
Por otra parte, el aceite de nuez puro presentó una menor estabilidad oxidativa, 8,47 meq oxígeno/kg aceite a

los 12 días de almacenamiento, separándose de los tratamientos anteriormente expuestos a partir del día 9. Sin embargo, los aceites de almendra, sésamo virgen y tostado, y sus respectivos *blends*, C:A [(20:80), (30:70), (40:60)], C:SV [(20:80), (30:70), (40:60)] y C:ST [(20:80), (30:70), (40:60)] mostraron valores bajos en la generación de productos de oxidación primaria. Los valores finales de IP para estos tratamientos fueron: 0,91; ND; 0,82; 2,96; 2,66; 2,01; 0,16; 0,50; 0,67; 0,83; 0,99; 1,33 meq oxígeno/kg aceite, respectivamente (**Figura 1 b**). Los aceites de almendra y sésamo (tanto virgen como tostado), y sus respectivas mezclas, presentaron a lo largo de todo el ensayo valores de IP inferiores a 3 meq oxígeno/kg aceite. Sin embargo, la incorporación de aceite de chía a los aceites puros genera una disminución de su estabilidad oxidativa ($p \leq 0,05$). Con respecto al aceite de almendra, el aumento en los valores de IP de sus mezclas resulta significativo a partir del día 2. En cuanto a los *blends* C:SV (30:70) y (40:60), el incremento de IP se evidencia a partir del día 10 de ensayo. Resulta importante resaltar que el tratamiento C:SV (20:80) no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al aceite de sésamo virgen durante el almacenamiento ($p \leq 0,05$). Finalmente, la mezcla C:ST (40:60) presentó una significativa menor estabilidad oxidativa ($p \leq 0,05$) que el aceite de sésamo tostado puro a partir del día 2; mientras que, las mezclas 30:70 y 20:80, mostraron una evolución en los valores de IP semejante a éste último a lo largo de los 12 días de ensayo ($p \leq 0,05$).

A pesar de que el aceite de sésamo contiene, en promedio, un 30% menos de ácido oleico que el aceite de almendra, los *blends* C:SV y C:ST presentaron menores valores de IP. Esto podría deberse a la presencia de compuestos biológicamente activos propios de la semilla de sésamo, llamados lignanos (Suja *et al*. 2004). Tales compuestos abarcan un grupo amplio y diverso de metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, formados a partir de la condensación de unidades fenilpropánicas (C6-C3). Sesamin y sesamolin son los lignanos liposolubles mayoritarios del sésamo, mientras que sesamol, sesaminol y sesamolinol, entre otros, se hallan en pequeñas cantidades (Dar y Arumugam 2013) (**Figura 2**). Se ha informado que sesamin y sesamolin no poseen gran actividad antioxidante, comparados con el sesamol (Suja *et al*. 2004, Lee *et al.* 2010). La concentración de estos compuestos en aceite de sésamo varía ampliamente de acuerdo a las condiciones de pre-tratamiento de la semilla y de los métodos de extracción de aceite. En este trabajo, el contenido de lignanos totales (expresado en equivalentes de sesamol) varió entre, 9,41 y 10,19 g/kg aceite, tanto para aceite de sésamo virgen como tostado, respectivamente. Por su parte, Wu (2007) encontró un contenido promedio de lignanos totales de 11,5 g/kg en aceite de sésamo comercial, mientras que Rangkadilok *et al.* (2010) informaron valores de sesamin y sesamolin en el rango de 0,93-2,89 g/kg y 0,30-0,74 g/kg, respectivamente.

Existe evidencia científica de que los lignanos del sésamo presentan un fuerte efecto inhibidor de la peroxidación lipídica, debido a su capacidad para transferir átomos de hidrógeno a radicales alquilo (Lee *et al.* 2010 y sus referencias). Más aún, se ha comprobado que ejercen un efecto sinérgico con los tocoferoles (Kochhar 2002). Si bien el contenido de tocoferoles totales (TT) determinado en este trabajo resultó mayor para aceite de almendra y sus *blends* en relación al resto de los tratamientos (**Tabla 3**), la mayor estabilidad oxidativa asociada al aceite de sésamo (tanto virgen como tostado) y sus mezclas podría atribuirse a un efecto sinérgico entre los TT y los lignanos presentes en la matriz lipídica. Por lo expuesto, es posible que estos antioxidantes reaccionen rápidamente con los compuestos de oxidación primaria, interrumpiendo el deterioro oxidativo de lípidos y retardando la formación de hidroperóxidos.

Figura 2. Algunos lignanos liposolubles.



En cuanto a la estabilidad oxidativa determinada por Rancimat, es posible observar que los tiempos de inducción (h) siguen una tendencia similar a la evolución de IP. Sin embargo, resulta importante destacar que el tratamiento C:ST (20:80) presentó el mayor tiempo de inducción de todos los *blends*, a pesar de que en relación a la mezcla C:SV (20:80), desarrolla un mayor contenido de peróxidos a lo largo de todo el ensayo (Figura 1b). Este hecho se debe a que durante el tratamiento térmico de las semillas, previo a la extracción de aceite, se generan compuestos de oxidación primaria y diversos volátiles (aldehídos, cetonas, alcoholes, pirazinas, furanos y pirroles) (Li *et al.* 2014). Aún así, la mayor estabilidad oxidativa de los *blends* C:ST podría explicarse a partir de la acción sinérgica establecida entre el sesamol, los tocoferoles y melanoidinas, producidas por reacciones de pardeamiento no enzimático durante el tostado de la semilla de sésamo (Fukuda *et al.* 1986, Yen 1990, Shimoda *et al.* 1997, Rostami *et al.* 2014). Éstas últimas conforman un grupo heterogéneo de moléculas a las que se les ha atribuido una gran actividad antioxidante. El mecanismo de esta actividad todavía no está claro y se encuentra en estudio. Posiblemente, su acción esté basada en la habilidad de atrapar especies electrofílicas cargadas positivamente, radicales oxigenados o cationes metálicos para formar complejos inactivos (Delgado-Andrade *et al.* 2005). En este trabajo, se observó que la componente "rojo" del color del aceite se intensificó con el aumento de la temperatura del tratamiento de la semilla previo al proceso de prensado, lo cual podría deberse al incremento en el contenido de melanoidinas. Este incremento en el desarrollo de color del aceite de sésamo tostado (33,02 ± 0,80) resultó significativo respecto al aceite proveniente de la semilla sin tratar (aceite de sésamo virgen, 23,26 ± 0,40).

Tabla 3. Contenido de tocoferoles totales de los distintos tratamientos.

Tratamiento[a]	TT[b] (µg/g aceite)
C	345,09[a] ± 3,24
A	544,42[h] ± 2,21
N	326,00[a] ± 0,12
SV	404,93[cd] ± 2,05
ST	437,17[ef] ± 1,18
C:A(20:80)	516,09[gh] ± 3,56
C:A(30:70)	493,10[g] ± 2,20
C:A(40:60)	453,98[f] ± 1,15
C:N(20:80)	329,03[a] ± 2,10
C:N(30:70)	348,38[a] ± 3,02
C:N(40:60)	350,61[ab] ± 3,13
C:SV(20:80)	419,61[de] ± 1,20
C:SV(30:70)	393,04[cd] ± 0,30
C:SV(40:60)	379,23[bc] ± 1,14
C:ST(20:80)	414,71[de] ± 0,45
C:ST(30:70)	416,29[de] ± 1,53
C:ST(40:60)	408,05[cde] ± 2,15

Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre muestras. [a]C: chía, A: almendra, N: nuez, SV: sésamo virgen, ST: sésamo tostado; [b]TT: Tocoferoles Totales.

En este trabajo, en cuanto a la evolución de IA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en ninguno de los tratamientos entre el tiempo inicial y a los 12 días de almacenamiento. Evidenciando que tanto los aceites puros como sus *blends* son estables frente a la degradación hidrolítica de los glicéridos aún en condiciones de termooxidación (**Tabla 4**).

Tabla 4. Valores finales de IA

Tratamiento[a]	IA[b] (% p/p ácido oleico)
C	1,18 ± 0,02
A	0,11 ± 0,01
N	0,13 ± 0,00
SV	2,94 ± 0,01
ST	2,18 ± 0,01
C:A(20:80)	0,41 ± 0,01
C:A(30:70)	0,53 ± 0,03
C:A(40:60)	0,71 ± 0,01
C:N(20:80)	0,33 ± 0,05
C:N(30:70)	0,55 ± 0,02
C:N(40:60)	0,70 ± 0,03
C:SV(20:80)	2,85 ± 0,02
C:SV(30:70)	2,49 ± 0,01
C:SV(40:60)	2,40 ± 0,01
C:ST(20:80)	2,11 ± 0,02
C:ST(30:70)	2,00 ± 0,01
C:ST(40:60)	1,97 ± 0,04

[a]C: chía, A: almendra, N: nuez, SV: sésamo virgen, ST: sésamo tostado; [b]IA: índice de acidez.

CONCLUSIONES

Los beneficios nutricionales que trae aparejado el consumo de aceite de chía se deben principalmente al contenido de ácidos grasos ω-3 y ω-6. Sin embargo, esta composición lipídica conlleva una desventaja tecnológica en cuanto a la estabilidad del producto. Se pudo comprobar que el desarrollo de *blends* de aceite de chía con aceites de frutos secos (nuez, almendro) y de algunas semillas oleaginosas (sésamo) ofrece una oportunidad para obtener matrices lipídicas ricas en ω-3 con una mayor estabilidad oxidativa que el aceite de chía puro. Los *blends* con aceite de sésamo (tanto virgen como tostado) mostraron la menor generación de productos de oxidación primaria a lo largo de todo el ensayo de termooxidación. Esto podría atribuirse a un efecto sinérgico entre los tocoferoles totales y los lignanos presentes en el aceite de sésamo.

En consecuencia, la formulación de *blends* de aceite de chía, representa una alternativa novedosa para la industria aceitera, actualmente interesada en aceites no convencionales provenientes de cultivos autóctonos revalorizados en el país y el continente.

BIBLIOGRAFÍA

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

Ayerza R., Coates W. 2004. Composition of chia (Salvia hispanica L.), grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. Tropical Science, 44 (3): 131-135.

Ayerza R., Coates W. 2011. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin commercially grown chia (Salvia hispanica L.). Industrial Crops and Products, 34:

1366-1371.
Bhatnagar AS., Hemavathy J., Krishna AG. (2015). Development of a rapid method for determination of lignans content in sesame oil. Journal of Food Science and Technology, 52 (1): 521-527.
Dar AA., Arumugam N. 2013. Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis – A review. Bioorganic Chemistry, 50: 1–10. http://doi.org/10.1016/j.bioorg.2013.06.009
Delgado-Andrade C., Rufián-Henares JA., Morales FJ. 2005. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(20): 7832–7836. http://doi.org/10.1021/jf0512353
Frankel E.N. 2005. Lipid oxidation. Ed. Barnes & Associates, Bridgwater, England.
Fukuda Y., Nagata M., Osawa T., Namiki M. 1986. Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil, and the effect of using the oil for frying. Agricultural and Biological Chemistry, 50(4): 857–862. http://doi.org/10.1271/bbb1961.50.857
Guiotto EN., Ixtaina VY., Nolasco SM., Tomás MC. 2014. Effect on Storage Conditions and Antioxidants on the Oxidative Stability of Sunflower-Chia Oil Blends. Journal of the American Oil Chemists´ Society, DOI 10.1007/s11746-014-2410-9
Hashempour-Baltork F., Mohammadali T., Azadmard-Damirchi S., Savage GP. 2016. Vegetable oil blending: A review of physicochemical, nutritional and health effects. Trends in Food Science and Technology, 57: 52-58.
Ixtaina VY., Nolasco SM., Tomás MC. 2008. Physical properties of chia (*Salvia hispánica* L.) seeds. Industrial Crops and Products, 28(3): 286-293.
Ixtaina VY., Martinez M., Spotorno V., Mateo CM., Maestri DM., Diehl BWK., 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.
Kavuncuoglu H., Capar TD., Karaman S., Yalcin H. 2016. Oxidative stability of extra virgin olive oil blended with sesame seed oil during storage: an optimization study based on combined design methodology. Food Measure. DOI 10.1007/s11694-016-9384-2
Kodad O., Alonso J., Espiau MT., Estopañán G., Juan T., Socias i Company. 2011. Chemometric characterization of almond germoplasm: Compositional aspects involved in quality and breeding. Journal of the American Society of Horticultural Science, 136: 273-281.
Kocchar SP. 2002. Sesame, rice-bran and flaxseed oils. En: Vegetable oils in food technology (F.D. Gunstone, Ed.). Blackwell Publishing, CRC Press, Oxford, UK, pp. 297-326.
Lee SW., Jeung MK., Park MH., Lee SY., Lee J. 2010. Effects of roasting conditions of sesame seeds on the oxidative stability of pressed oil during thermal oxidation. Food Chemistry, 118: 681-685.
Li H., Fan Y-W., Li J., Tang L., Hu J-N., Deng Z-Y. 2013. Evaluating and Predicting the Oxidative Stability of Vegetable Oils with Different Fatty Acid Compositions. Journal of Food Science, 78 (4): 633-641.
Li Y., Ma W-J., Qi B-K., Rokayya S., Li D., Wang J., Feng H-X., Sui X-N., Jiang L-Z. 2014. Blending of Soybean Oil with Selected Vegetable Oils: Impact on Oxidative Stability and Radical Scavenging Activity. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15: 2583-2589.
Maestri D., Martínez M., Bodoira R., Rossi Y., Oviedo A., Pierantozzi P., Torres M. 2015. Variability in almond oil chemical traits from traditional cultivars and native genetic resources from Argentina. Food Chemistry, 170: 55-61.
Martínez M., Mattea M., Maestri D. 2008. Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. Journal of Food Engineering, 88: 399-404.
Martínez M., Labuckas D., Lamarque A., Maestri D. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): Genetic resources, chemistry, by-products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90: 1959-1967.
Martínez ML., Marín MA., Salgado Faller CM., Revol J., Penci MC., Ribotta PD. 2012. Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. LWT- Food Science and Technology, 47: 78-82.
Martínez ML., Penci MC., Ixtaina V., Ribotta PD., Maestri, D. 2013a. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. LWT-Food Science

and Technology, 51: 44-50.
Martínez ML., Penci MC., Marin MA ., Ribotta PD., Maestri, D. 2013b. Screw press extraction of almond (*Prunus dulcis* (miller) D.A. Webb): Oil recovery and oxidative stability. Journal of Food Engineering, 119:40-45.
Ortega-Nieblas M., Robles-Burgueño MR., Vázquez-Moreno L. 2001. Evaluación Oxidativa de las Mezclas de Aceites de Leguminosas del Desierto de Sonora con Aceites de Maíz y Soja Durante su Almacenamiento. Grasas Aceites, 52: 355-362.
Rangkadilok N., Pholphana N., Mahidol C., Wongyai W., Saengsooksree K., Nookabkaew S., Satayavivad J. 2010. Variation of sesamin, sesamolin and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand. Food Chemistry, 122: 724-730.
Rodea-González DA., Cruz-Olivares J., Román-Guerrero A., Rodríguez-Huezo ME., Vernon-Carter EJ., Pérez-Alonso C. 2012. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (Salvia hispanica L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. Journal of Food Engineering, 111(1): 102-109.
Rostami M., Farzaneh V., Boujmehrani A., Mohammadi M., Bakhshabadi H. 2014. Optimizing the extraction process of sesame seed's oil using response surface method on the industrial scale. Industrial Crops and Products, 58: 160–165.
Shimoda M., Nakada Y., Nakashima M., Osajima Y. 1997. Quantitative Comparison of Volatile Flavor Compounds in Deep-Roasted and Light-Roasted Sesame Seed Oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43:3193–3196.
Suja KP., Jayalekshmy A., Arumughan C. 2004. Free Radical Scavenging Behavior of Antioxidant Compounds of Sesame (Sesamum indicum L.) in DPPH System. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 912–915. http://doi.org/10.1021/jf0303621
Umesha SS., Manohar RS., Indiramma AR., Akshitha S., Naidu KA. 2015. Enrichment of biscuits with microencapsulated omega-3 fatty acid (Alpha-linolenic acid) rich Garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil: Physical, sensory and storage quality characteristics of biscuits. LWT-Food Science and Technology, 62(1): 654-661.
Wong ML., Timms RE., Goh EM. 1988. Colorimetric Determination of Total Tocopherols in Palm Oil, Olein and Stearin. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 65(2): 258-261.
Wu W-H. 2007. The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating. Food Chemistry, 104 (1): 341-344.
Yada S., Lapsley K., Huang G. 2011. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. Journal of Food Composition and Analysis, 24: 469-480.
Yen GC. 1990. Influence of seed roasting process on the changes in composition and quality of sesame (*Sesame indicum*) oil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 50: 563–570. http://doi.org/10.1002/jsfa.2740500413
Yoshida H., Takagi S. 1997. Effects of Seed Roasting Temperature and Time on the Quality Characteristics of Sesame (*Sesamum indicum*) Oil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 75: 19–26.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo fue llevado a cabo gracias a subsidios otorgados por CONICET (PIP 112201210018), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT B 203/14), FONCyT (BID PICT 2014-2283) y Secretaría de Políticas Universitarias (SPU-Ministerio de Educación).

Produccion de fideos frescos a partir de pure deshidratado de mandioca, con el agregado de goma

Brousse M.[1]; Vergara L.[1]; Monaca A.[1]; Kachuck K.[1]; Lopez, G.[1]; Fernandez P.[1]

(1) Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.
brousse.mariamarcela@gmail.com

RESUMEN

El objetivo fue estudiar el efecto de la adición de puré de mandioca deshidratado en distintas proporciones (0, 20, 40, 60 y 80%) a la harina de trigo en la elaboración de fideos frescos. Se determinaron tiempo óptimo de cocción, variación del color (L*, a*, b*) en función de los días de almacenamiento, textura y análisis sensorial. Los fideos con mayor porcentaje de puré de mandioca tuvieron el menor tiempo de cocción, el mayor grado de color y los menores valores de ΔE*, diferencia de color. Los valores de L* disminuyeron linealmente con el almacenamiento, pero aumentaron con la concentración de puré de mandioca. Para los fideos cocidos en su tiempo óptimo, la firmeza varió entre 10,8 y 4,5 N, disminuyendo con el incremento en la concentración de puré de mandioca. En la evaluación sensorial, la mayor aceptabilidad global fue para los fideos con 20% de puré. Los fideos con un 80% de puré de mandioca no fueron aceptados por los evaluadores. Los resultados sugieren aumentar el número de evaluadores para obtener mayor certeza.

Palabras claves: Puré de mandioca, pastas, goma xántica, textura, color, tiempo óptimo de cocción.

ABSTRACT

The objective was to study the effect of the addition of dehydrated mashed cassava in different proportions (0, 20, 40, 60 and 80 %) to wheat flour in fresh noodles production. Optimal cooking time, color change as a function of storage, texture and sensory analysis were determined. Noodles with the highest percentage of mashed cassava had less cooking time, highest color grade and lower values of ΔE*, color difference. Values of L* decreased linearly with increasing storage days but rise with increasing mashed cassava concentration. Firmness for optimal time cooked noodles ranged from 10.8 to 4.5 N, but decreases with increasing concentration of mashed cassava. Sensory evaluation of the overall acceptability was the highest for noodles with 20 % of mashed cassava. Noodles with 80% mashed cassava were not accepted by evaluators. The results suggest increasing the number of evaluators for greater certainty.

Keywords: Mashed cassava, pastas, xanthan gum, texture, color, optimum cooking time.

INTRODUCCIÓN

Las pastas son cocidas tradicionalmente en un exceso de agua en una proporción de 1:10, a temperatura de ebullición (Menger 1979) con diferentes períodos de tiempo, dependiendo de la textura deseada en el producto final (Edwards et al. 1993; Riva et al. 1994). El tiempo de cocción óptimo para la pasta, se determina por absorción de agua y gelatinización del almidón (Delcour et al. 2000; Grzybowski y Donnelly 1979) o por la evaluación textural de firmeza de la pasta (Edwards et al. 1993; Riva et al. 1994). Dependiendo de la formulación estos tiempos de cocción varían. Las propiedades de textura de las pastas cocidas son el factor principal en la evaluación global de la calidad de ellas y desempeñan un papel dominante al influir en la aceptación por parte del consumidor. Las pastas tradicionalmente se realizan con harina de trigo, pero se han realizado varios estudios para encontrar fuentes alternativas para producir la pasta mediante la sustitución del trigo (Chillo et al. 2008, Fiorda et al. 2013). Sin embargo, la sustitución de la harina de trigo no siempre es ventajosa porque la pasta elaborada con harinas alternativas pueden presentar altas pérdidas en sólidos durante la cocción en agua y una adhesividad excesiva. Las proteínas en las materias primas que no sean trigo no son capaces de componer una estructura similar a la red de gluten

(Pagani 1986). El reemplazo de la harina de trigo con productos tales como el almidón de yuca muestran características de gran interés industrial, y por esta razón se emplea directamente en su forma nativa en formulaciones de alimentos como pan, pasteles, galletas y pasta alimenticia (El-Dash et al. 1994; Menegassi y Leonel 2005; Shittu et al. 2008). Otro subproducto del procesamiento de la mandioca o yuca es el puré de mandioca elaborado por la Cooperativa San Alberto Ltda. de la provincia de Misiones, Argentina. A fin de evaluar la posibilidad de introducir el puré de mandioca como sustituto de la harina de trigo en la elaboración de pastas, en el presente estudio se analizaron los parámetros de color, textura y otras propiedades de las pastas cocidas y crudas, elaboradas con la incorporación de dicho puré.

MATERIALES Y MÉTODOS

El puré de mandioca se incorporó en las recetas como se indica en la **tabla 1**. También se preparó una pasta control de 100% con 100% (w/w) de harina de trigo.

Los ingredientes se mezclaron durante 3 minutos para permitir la hidratación de la harina y el puré de mandioca y se extrudaron como fideos tipo espaguetis (0,3 mm de diámetro) usando una fabricadora de pasta marca ATMA modelo FP 4070.

Tabla 1. Formulación de las pastas con el agregado de gomas.

	Porcentaje total en las fórmula				
Receta	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
harina de trigo 0000	100	80	60	40	20
puré de mandioca	0	20	40	60	80
	Cantidad de los ingredientes				
Receta	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
harina de trigo 0000 (g)	190	152	114	76	38
puré de mandioca (g)	0	38	76	114	152
Aceite (g)	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
Huevo (g)	80	80	80	80	80
Propionato de calcio (g)	0,255	0,255	0,255	0,255	0,255
Goma xántica (g)	19	19	19	19	19
Agua (g)	19	19	19	19	19

Tiempo óptimo de cocción

Tiempo de cocción óptimo se determinó a través del método aprobado 66-50 (AACC, 2000). Los fideos (10 g) fueron colocados en 300 ml de agua a ebullición, en un vaso de 500 ml. Después de 9 minutos de cocción, se retiraron las hebras de fideos del agua hirviendo, a intervalos de 30 s, y se comprimieron entre dos piezas de vidrio transparente. El tiempo de cocción óptimo correspondió a la desaparición del color blanco en el núcleo central de los espaguetis.

Cambios de color con el tiempo de almacenamiento

Los fideos obtenidos fueron colocados en cajas de petri de 50 mm de diámetro y 10 mm de altura, realizándose las mediciones de color el primer día de elaboración de los fideos y luego cada tres días hasta el día 15, para cada una de las recetas elaborados. Las coordenadas de color se determinaron usando un colorímetro marca HunterLab, modelo D25-9 (Hunter Associates Laboratory, Reston, Virgina, USA). Se midió el color según el sistema CIELab. El equipo fue estandarizado usando los patrones blanco y negro. Se determino la Diferencia Total de Color (ΔE^*) según la ecuación 1.

$$\Delta E^* = \left[(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b - b_0^*)^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

donde, *L*, a* y b** son los parámetros de color de los fideos con puré de mandioca, a las distintas concentraciones y L_0^*, a_0^* y b_0^* son las lecturas de los parámetros de color de las fideos preparado solamente con harina de trigo.
El grado de color (GC) y su variación durante el almacenamiento se determino usando la ecuación 2*:*

$$GC = (L^* + (b^* \times 2))/20 \quad (2)$$

El grado de color se mide en una escala de 1a10, siendo 10 la calificación más favorable (Hareland et al. 1995).
La variación de parámetro L* con los días de almacenamiento se modelaron a través de una ecuación lineal.

Análisis de textura

La firmeza se obtuvo utilizando un texturómetro (mod. TA.XT plus, Stable Micro Systems, la Vienna Court, UK) equipado con una celda de carga de 25 kg. Se realizó una evaluación de firmeza de los fideos crudos y cocidos, siguiente el método AACC 16-50 (AACC, 2000). Las muestras fueron cortadas (5 cm) en su momento óptimo de cocción para las muestras cocidas y una vez terminado el extruido para los crudos; colocándolos en una plancha.
La variación de la firmeza con la concentración del puré de mandioca se modeló a través de las ecuaciones:

$$Firmeza(N) = aX + b \quad (3)$$

$$Firmeza(N) = a + bX + cX^2 \quad (4)$$

donde *a, b y c* son los parámetros de los modelos y X son las concentraciones 20, 40, 60 y 80%.

Análisis sensorial

Se utilizaron cinco formulaciones de fideos, con el fin de probar la aceptabilidad del producto, se llevó a cabo un análisis sensorial, utilizando una escala hedónica semi-estructurada (Cocci et al., 2008). Las mismas fueron preparadas un día antes de los ensayos y almacenadas en refrigeración (5°C). Para el momento del ensayo se cocinaron los fideos según sus respectivos tiempos de cocción. El análisis sensorial se realizó mediante un panel no seleccionado ni entrenado de 13 miembros.
Los atributos probados fueron la apariencia (relacionada con el color), el sabor, la consistencia (relacionada con la textura) y la aceptabilidad global. Cada panelista recibió una hoja de formulario para evaluar los atributos mencionados, utilizando una escala hedónica de nueve puntos anclada con "Me desagrada muchísimo" y "Me agrada muchísimo" en ambos extremos, con un punto neutro "Ni me gusta ni me disgusta".
Las pruebas se realizaron en una sala aislada con buena iluminación y ventilación natural.
Para cada descriptor (color, sabor, textura y aceptabilidad global) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para probar diferencias significativas ($P < 0,05$) atribuibles a las muestras.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante los softwares Statgraphics Plus para DOS, versión 7.0 (Manugistics, Inc., USA) y GraphPad Prism, versión 5.04 para Windows (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Las herramientas estadísticas empleadas fueron ANOVA, Análisis de Componentes Principales y análisis de varianza, todos a un nivel de significancia del 5%. Los coeficientes de correlación de Pearson también fueron calculados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo óptimo de cocción

Los tiempos de cocción óptimos de las distintas recetas se reportan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Tiempos óptimos de cocción, firmeza en fideos frescos crudos y fideos cocidos

Receta	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Concentración de puré en los fideos (%)	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**
Tiempo óptimo de cocción (min)	7,1±0,3[a]	6,1±0,1[b]	5,1±0,2[c]	4,07±0,06[d]	3,1±0,2[e]
Firmeza (N) fideos crudos	29,6±0,8[a]	26,3±0,3[b]	24,8±0,6[b]	22,3±0,7[c]	16,3±0,2[d]
Firmeza (N) fideos cocidos	10,8±0,2[a]	6,7±0,3[b]	6,5±0,1[b]	6,23±0,09[b]	4,5±0,2[c]

Los valores son promedio de tres repeticiones ± error estándar.
** Distintos superíndices en la misma fila indica que existen diferencias significativas (p<0,05).*

Los resultados mostraron que el tiempo óptimo de cocción se vio afectada por la concentración del puré de mandioca (p<0,05). Podemos observar en la **tabla 1** que a medida que se aumenta el contenido de puré de mandioca en la composición de los fideos frescos, fue disminuyendo el tiempo de cocción.
En espaguetis frescos preparados con pulpa de papa seca y harina de amaranto, el tiempo óptimo de cocción fue más bajo que los del presente estudio, con valores de 2 a 4 min (Bastos et al. 2016). Chang y Flores (2004) desarrollaron pastas frescas utilizando diferentes proporciones de sémola de trigo duro y harina de trigo blando y observaron que el tiempo óptimo de cocción fue entre 5 y 6 minutos, próximos a los de este trabajo.
En la caracterización de espaguetis sin gluten a base de harina de maíz y diferentes harinas vegetales (alcachofa, espárragos, calabaza, calabacín, tomate, pimiento amarillo, pimiento rojo, pimiento verde, zanahoria, brócoli, espinaca, berenjena e hinojo) se mostro que la de continuidad de la red de proteínas-almidón pareció facilitar la difusión de agua a través de la matriz del espagueti, reduciendo el tiempo que el agua emplea para llegar al centro del fideo durante la cocción (Padalino et al. 2013). Chillo et al. 2007, encontraron que la ausencia de red de gluten en los espaguetis en base a harina de amaranto influencia el tiempo de cocción óptimo.

Cambios de color con el tiempo de almacenamiento
En la **tabla 2** se muestra que los valores de luminosidad disminuyen gradualmente con el aumento de los días de almacenamiento. También es importante observar que, a medida que aumenta la concentración del puré de mandioca en la composición de los fideos, la iluminación también es afectada de manera positiva, con una tendencia, aunque mínima, hacia *L** más claros.
En la **tabla 3** se observa que para todas las muestras con puré de mandioca en su composición, se tiene el mejor grado de color para el primer día de almacenamiento y la menor puntuación para el último. El grado de color más alto fue para las recetas que contiene mayor cantidad de puré de mandioca.
En la **tabla 4** se observa que los menores valores de ΔE* se obtienen para las muestras que tienen en su formulación la menor cantidad de puré de mandioca, entre los 10 y 12 días de almacenamiento. La diferencia se hace más notoria, con el aumento de la concentración de puré en las formulaciones

Tabla 2. Determinación de valores de L* en función de los días de almacenamiento y la concentración porcentual del puré de mandioca en la masa de los fideos.

Días de almacenamiento	Concentración (%)				
	0	20	40	60	80
1	63,1±0,6[aA]	63,4±0,5[aAB]	64,6±0,3[aBC]	64,89±0,07[aC]	65,4±0,2[aC]
3	60,7±0,1[bA]	61,3±0,4[bA]	63,2±0,3[bB]	63,3±0,6[bB]	64,9±0,4[aC]
5	59,0±0,5[cA]	60,14±0,04[bB]	62,38±0,02[cC]	63,1±0,2[bCD]	63,9±0,5[bD]

8	55,6±0,2^{dA}	58,5±0,4^{cB}	61,3±0,2^{dC}	61,8±0,6^{cC}	63,5±0,2^{bD}
10	54,7±0,4^{deA}	55,5±0,5^{dA}	57,46±0,1^{eB}	59,8±0,4^{dC}	63,3±0,1^{bD}
12	54,0±0,1^{eA}	55,0±0,3^{dB}	57,6±0,1^{eC}	59,5±0,3^{dD}	62,3±0,2^{cE}

Los valores son promedio de tres repeticiones ± error estándar.
** Distintos superíndices en minúsculas en la misma columna indica que existen diferencias significativas (p<0,05) y distintos superíndices en mayúsculas en la misma fila indica que existen diferencias significativas (p<0,05).*

Tabla 3. Determinación del grado de color en función de los días de almacenamiento y la concentración porcentual del puré de mandioca en la masa de los fideos.

Días de almacenamiento	Concentración (%)				
	0	20	40	60	80
1	6,527±0,001^{a}	6,63±0,03^{a}	6,71±0,01^{a}	6,78±0,003^{a}	6,82±0,01^{a}
3	6,26±0,05^{b}	6,33±0,03^{b}	6,43±0,01^{b}	6,45±0,03^{b}	6,57±0,01^{b}
5	6,05±0,04^{c}	6,12±0,07^{c}	6,27±0,03^{c}	6,38±0,01^{bc}	6,44±0,02^{c}
8	5,87±0,05^{d}	6,03±0,05^{c}	6,23±0,02^{c}	6,280±0,001^{c}	6,40±0,01^{cd}
10	5,72±0,01^{e}	5,82±0,05^{d}	5,99±0,03^{d}	6,15±0,06^{d}	6,38±0,05^{cd}
12	5,54±0,03^{f}	5,63±0,05^{e}	5,989±0,007^{d}	6,13±0,05^{d}	6,30±0,04^{d}

Los valores son promedio de tres repeticiones ± error estándar.
** Distintos superíndices en la misma columna indica que existen diferencias significativas (p<0,05).*

Tabla 4. Cálculo de los valores de ΔE* en función de los días de almacenamiento y la concentración porcentual del puré de mandioca en la masa de los fideos.

Concentración (%)	Días					
	1	3	5	8	10	12
20	2,9±0,3^{aAC}	2,2±0,2^{aAB}	2,1±0,2^{aAB}	3,3±0,3^{aC}	2,1±0,4^{aAB}	1,9±0,4^{aB}
40	2,6±0,2^{aA}	3,8±0,2^{bBC}	4,1±0,4^{bCD}	5,8±0,2^{bE}	3,4±0,1^{bB}	4,5±0,2^{bD}
60	2,8±0,3^{aA}	3,5±0,4^{bA}	5,2±0,2^{cB}	6,6±0,6^{bC}	5,6±0,4^{cBC}	6,4±0,5^{cBC}
80	3,3±0,1^{aA}	5,5±0,4^{cB}	6,1±0,3^{dB}	9,6±0,1^{cC}	9,0±0,1^{dC}	9,1±0,3^{dC}

Los valores son promedio de tres repeticiones ± error estándar.
** Distintos superíndices minúsculas en la misma columna indica que existen diferencias significativas (p<0,05), Distintos superíndices mayúscula en la misma fila indica que existen diferencias significativas (p<0,05).*

Los datos del parámetro de color *L** de los fideos frescos y la variación con los días de almacenamiento (1, 3, 5, 8, 10, 12 días), se ajustaron al modelo lineal.
Los parámetros de las ecuaciones y la bondad del ajuste del modelo se encuentran resumidos en la **tabla 5**.

Tabla 5. Ajuste de la variación de L* en función de los días de almacenamiento para cada masa de fideos.

Concentración (%)	a	b	Bondad de ajuste			
			R^2	RMSE	MBE	E %

0	-0,85 ± 0,05	63,39 ± 0,40	0,94	0,67	0,11	0,97
20	-0,77 ± 0,05	63,96 ± 0,38	0,94	0,57	-0,05	0,83
40	-0,68 ± 0,05	65,49 ± 0,38	0,92	0,88	-0,10	1,23
60	-0,49 ± 0,05	65,25 ± 0,34	0,88	0,39	-0,07	0,58
80	-0,26 ± 0,03	65,60 ± 0,23	0,82	0,39	-0,07	0,58

En la **Tabla 5** se observa que se obtuvo un buen ajuste para el modelo lineal con las distintas recetas ensayadas.

Análisis de textura

Firmeza de la pasta cruda

Se observa en la **tabla 1** que a medida que aumentamos la concentración de puré de mandioca en las recetas para los fideos crudos, la firmeza en las pastas va disminuyendo. Esta disminución de la firmeza se debe a la disminución de la red de proteínas del gluten, al disminuir la presencia de harina de trigo en las formulaciones. El ANOVA muestra que, para la pasta cruda, la concentración de puré de mandioca influyó significativamente en la textura de las pastas ($p<0,05$).

Firmeza de la pasta cocida

La textura se define como uno de los atributos sensoriales de la pasta y la forma en que su estructura reacciona a la fuerza aplicada. Esta es uno de los aspectos críticos de la evaluación de la calidad de una pasta (Raina et al. 2005). Para los fideos con puré de mandioca cocidos en su tiempo óptimo, la fuerza de corte se situó entre 10,8 y 4,5 N (**Tabla 7**). Podemos observar que al aumentar las concentraciones del puré en las masas de los fideos, la firmeza va disminuyendo. La firmeza de la pasta cocida sigue la misma tendencia que las pastas crudas.

El porcentaje de puré de mandioca en las distintas recetas influyeron significativamente ($p<0,05$) en la textura de las pastas.

En la **Figura 1** se presentan las variaciones de la firmeza (N) para los fideos crudos (A) y cocidos (B) en función de las distintas concentraciones de puré de mandioca en su masa.

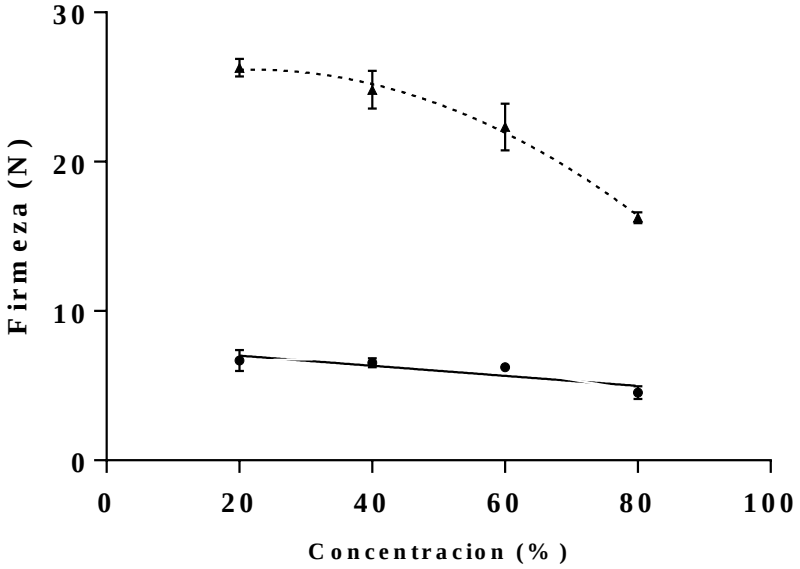


Figura 2. Valores experimentales y ajuste por la ecuación lineal de la firmeza en fideos crudos (●) y por la ecuación cuadrática de la firmeza en fideos cocidos (▲) con distintas concentraciones de puré de mandioca.

Las pastas realizadas con 80% de puré de mandioca presentaron las mayores pérdidas durante la cocción y la firmeza más baja (4,5N), a pesar del agregado de goma xántica. Para un bajo contenido de proteínas, el agua influye marcadamente, ya que un aumento en su contenido produce una notable disminución en la fuerza de corte. Malcolmson et al. (1993), trabajando sobre parámetros de calidad de espagueti encontró que la firmeza se ve afectada principalmente por el nivel de proteína, coincidiendo con Walsh y Gilles (1971) y Alamprese et al. (2005), quienes afirmaron que la exposición de la pasta al huevo, elaborada con harina de trigo, a un tratamiento hidrotérmico (cocción) se forma una red de proteínas compacta que mejora la incorporación de los gránulos de almidón en la superficie y da lugar a una estructura más firme. Esto es coincidente con los resultados aquí expuestos, donde el valor más alto de firmeza correspondió a fideos elaborados solo con harina de trigo, con un valor de 10,77 N.

Análisis sensorial

Los resultados del estudio de aceptabilidad se muestran en la **Figura 3**. Esta figura indica el porcentaje de aceptabilidad en cada Atributo: color, sabor, textura y aceptabilidad general, obtenidos a partir de las marcas realizadas en la escala hedónica, considerando aceptable cuando el valor otorgado a la muestra fue mayor o igual a 7, es decir a partir de "me gusta bastante" utilizados en la hoja de evaluación.

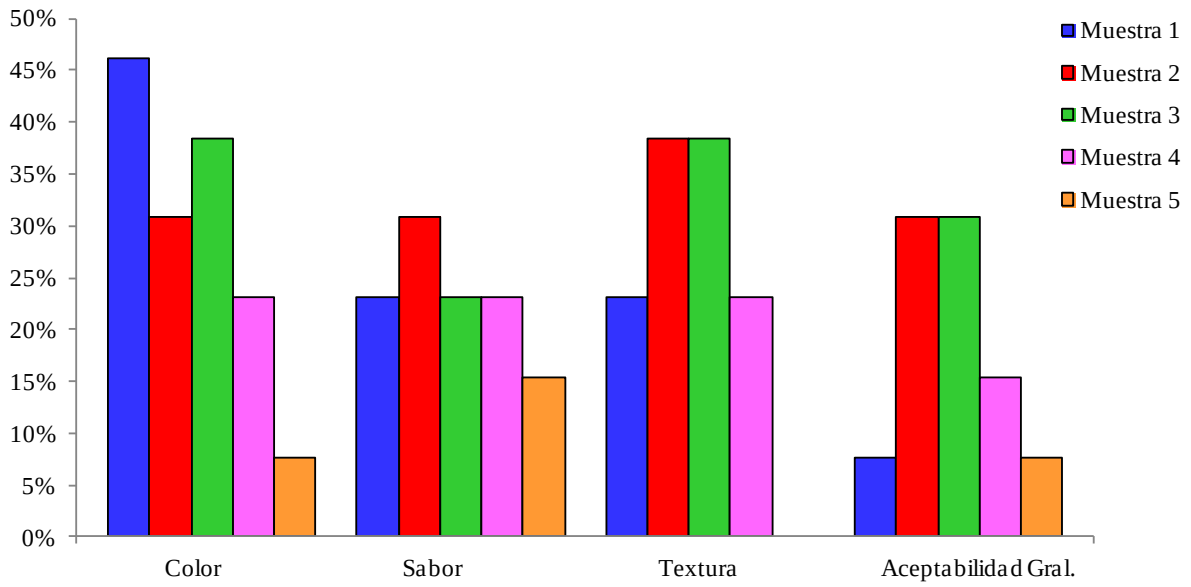


Figura 3. Análisis sensorial sobre aceptabilidad general de distintas muestras de fideos.

Estos resultados indican que la pasta sin puré de mandioca tuvo la menor aceptabilidad general, y las muestras 2 y 3, presentaron los mayores porcentajes en textura, lo que repercute positivamente en la "Aceptabilidad general".

El análisis de varianza confirma que el agregado de puré de mandioca en las muestras fue significativo. Las diferencias entre las muestras fueron significativas en color, textura y aceptabilidad global ($P < 0,05$). Para tener mayor certeza se requiere aumentar el número de evaluadores.

CONCLUSIONES

La adición del puré de mandioca en todas las concentraciones estudiadas, mostró una disminución en la firmeza para todos los casos estudiados. La interrupción de la matriz de proteína provoca cambios en la textura de superficie por la desintegración de los gránulos de almidón durante la cocción, mediada por el agua que ingresa. La pérdida por cocción aumentó con la concentración del puré de mandioca, al reducirse proporcionalmente la presencia de harina de trigo. El cambio de color hacia tonalidades más claras o luminosas (parámetro L*) experimentado por las pastas enriquecidas con puré de mandioca supone una valoración positiva por parte del consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

AACC (2000). AACC international approved methods of analysis (10th ed.). St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemist.

Alamprese C, Lametti S, Rossi M, Bergonzi D. 2005. Role of pasteurization heat treatments on rheological and protein structural characteristics of fresh egg pasta. European Food Research and Technology, 221: 759–

767.
Bastos GM, Soares M, Caliari M, de Araujo Pereira A, de Morais C, Hidalgo Campos M. 2016. Physical and sensory quality of gluten-free spaghetti processed from amaranth flour and potato pulp. LWT - Food Science and Technology, 65: 128-136.
Chang YK and Flores HE. 2004. Qualidade tecnológica de massas alimentícias frescas elaboradas de semolina de trigo durum (T. durum L.) e farinha de trigo (T. aestivum L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, 4 (4): 487-493.
Chillo S, Laverse J, Falcone Del Nobile M. 2007. Effect of carboxymethylcellulose and pregelatinized corn starch on the quality of amaranthus spaghetti, Journal of Food Engineering, 83: 492-500.
Chillo S, Laverse J, Falcone P and Del Nobile M. 2008. Quality of spaghetti in base amaranthus wholemeal flour added with quinoa, broad bean and chickpea. Journal of Food Engineering, 84: 101-107.
Cocci, E., Sacchetti, G., Vallicelli, M., Angioloni, A., Dalla Rosa, M. 2008. Spaghetti cooking by microwave oven: cooking kinetics and product quality. Journal of Food Engineering, 85: 537‑546.
Delcour J, Vansteelandt J, Hythier M, Abécassis J, Sindic M and Deroanne C. 2000. Fractionation and Reconstitution Experiments Provide Insight into the Role of Gluten and Starch Interactions in Pasta Quality, J. Agric. Food Chem, 48: 3767-3773.
Edwards N, Izydorczyk M, Dexter J and Biliaderis C. 1993. Cooked pasta texture: comparision of dynamic viscoelastic properties. Cereal Chemistry, 70: 122-126.
El-Dash A, Mazzari M, Germani R. 1994. Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinha mista de trigo e mandioca na produção de pães. EMBRAPA-SPI, 1: 88.
Fiorda F, Soares Júnior M, Silva F, Grosmann M, Souto L. 2013. Microestructure, texture and colour of gluten-free pasta made with amaranth flour, cassava starch and cassava bagasse. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie/Food Science. Technology, 54: 132-138.
Grzybowski R and Donnelly B. 1979. Cooking properties of spaghetti and factors affecting cooking quality. Journal of Agricultural Food Chemistry, 27: 380-384.
Hareland G, Puhr D, Wear J and Skunberg M. 1995. Color score: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service in cooperation with the ND state agricultural experiment stations, quality evaluation of durum wheat cultivars.
http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/gopher/Quality/Durum/1995/95durum.txt.html
Malcolmson L, Matsuo R, Balshaw R. 1993. Textural optimization of spaghetti using response surface methodology: Effects of drying temperature and durum protein level. Cereal Chemistry, 70: 417–423.
Menegassi B and Leonel M. 2005. Efeito da adição de farinha de mandioquinha-salsa nas características de massa alimentícia. Publ. UEPG Ciências Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa, 11 (3): 13-19.
Menger A. 1979. Crucial points of view concerning the execution of pasta cooking tests and their evaluation. Pag 53 in: Comptes Rendus ICC. Proc. Int. Symp.: Matieres Premieres et Pates Alimentaires. G. Fabriani and C. Lintas, eds. Ist. Naz. Nutrizione, Rome.
Padalino L, Mastromatteo M, Lecce L, Cozzolini F and Del Nobile M. A. 2013. Manufacture and characterization of gluten-free spaghetti enriched with vegetable flour. Journal of Cereal Science, 57: 333-342.
Pagani M. 1986. Pasta products from conventional raw materials. In C. Mercier, & C. Cantarelli (Eds.), Pasta and extrusion cooked foods: some technological and nutritional aspects 53-68. Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
Raina C, Singh S, Bawa S and Saxena D. 2005. Textural characteristics of pasta made from rice flour supplemented with proteins and hydrocolloids. Journal of Texture Studies, 36: 402-420.
Riva M, Schiraldi A and Piazza L. 1994. Characterization of rice cooking: isothermal differential scanning calorimetry investigations. Thermochimica Acta, 246: 317–328.
Shittu T, Dixon A, Awonorin S, Sanni L, Maziyadixon B. 2008. Bread from composite cassava genotype and nitrogen fertilizer on bread quality. Food Res. Int., 41: 568-578.
Walsh D and Gilles K. 1971. The influence of protein composition on spaghetti quality. Cereal Chemistry, 48: 544-554.

Estudio de las propiedades reológicas de las masas elaboradas a base de harina de arroz y sustitutos de gluten seleccionados

Cajas Locke J.[1], Loubes M.A.[1], Tolaba M.P.[1]

(1) Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ, UBA-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.
mtolaba@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se evaluó el efecto de tres sustitutos del gluten (goma xántica:GX, alginato de sodio:AL y goma guar:GG), según un diseño de mezclas centroide simplex; sobre las propiedades reológicas de las masas crudas elaboradas a base de harina de arroz. Las propiedades reológicas fueron determinadas en un reómetro de esfuerzo controlado, dentro de la región viscoelástica lineal. El barrido de frecuencia mostró la independencia del módulo elástico en un amplio rango (1-50 Hz). La GG presentó el mayor carácter elástico, observándose comportamientos similares para la GX y GX-GG. La presencia de AL en las mezclas provocó una disminución del carácter elástico de la masa. En los ensayos de deformación-relajación, las masas con menor resistencia fueron las elaboradas con AL mientras que, las que ofrecieron mayor resistencia fueron las masas con GX y GX-GG, seguidas de la masa con GG y GX-AL. Valores intermedios de deformación se obtuvieron con GG-AL y la mezcla ternaria. A su vez, los datos experimentales ajustaron satisfactoriamente (R^2>0,99) al modelo de Burgers, siendo las deformaciones mayores en el caso de la masa con AL. Los diferentes sustitutos empleados mostraron comportamientos viscoelásticos diferenciados. Además, el diseño de mezclas permitió cuantificar los efectos sinérgicos presentes en combinaciones de sustitutos.

Palabras clave: propiedades viscoelásticas, gomas, alginato de sodio, diseño de mezclas.

ABSTRACT

The effect of three gluten substitutes (xanthan gum:GX, sodium alginate:AL and guar gum:GG) on the rheological properties of raw doughs prepared from rice flour was evaluated, according to a simplex-centroid mixture design. The rheological properties were determined by a controlled-stress rheometer, within the linear viscoelastic region. The frequency sweep showed the independence of the elastic modulus over a wide range (1-50 Hz). The GG presented the highest elastic character, and a similar behavior was observed for GX and GX-GG. Dough elastic properties decreased due to the presence of AL. In creep-recovery tests, less resistance doughs were produced using AL while, which offered more resistance were the doughs with GX and GX-GG, followed by dough with GG and GX-AL. Intermediate deformation values were obtained with GG-AL and the ternary mixture. In turn, the experimental data were satisfactorily fitted (R^2> 0.99) by Burgers model, being the greatest deformation in the case of dough with AL. The different employed substitutes showed differentiated viscoelastic behavior. Furthermore, the mixtures design allowed to quantify the synergistic effects present in combinations of substitutes.

Keywords: viscoelastic properties, gums, sodium alginate, mix design.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la demanda de alimentos y en particular, de panificados innovadores libres de gluten, está relacionado con el creciente interés de los consumidores por llevar a cabo una dieta que evite el gluten, ya sea por padecer celiaquía o bien en forma preventiva por otras enfermedades gastrointestinales (Peña y Rodrigo 2013).

Las gliadinas y gluteninas conforman la mayoría de las proteínas presentes en el gluten. Los términos gliadinas y gluteninas son usados comúnmente para designar las proteínas de almacenamiento del trigo, aunque Osborne (1907) sugirió los nombres genéricos, prolaminas y glutelinas, para las fracciones equivalentes de otros cereales tales como avena, cebada o centeno.
Algunos cereales libres de gluten considerados aptos para ser consumidos son el maíz, el sorgo y el arroz. Este último es el más utilizado, debido a su bajo contenido de prolaminas y sodio, su carácter hipoalergénico, sabor insípido, y alto contenido de carbohidratos de fácil digestión (Gujral y Rosell 2004).
La elaboración de panificados a base de harina de arroz presenta una considerable dificultad tecnológica, debido a la falta de proteínas formadoras del gluten, el cual constituye la estructura más importante en la producción del pan (Sivaramakrishnan et al. 2004). Por lo tanto, la matriz del gluten es un factor determinante de las características reológicas importantes de la masa, como la elasticidad, la extensibilidad, la resistencia al estiramiento, la tolerancia a la mezcla, y la capacidad de retención del gas (Lazaridou et al. 2007).
Así mismo, con el propósito de imitar los atributos de los productos elaborados con trigo, se han incorporado a las formulaciones diversos hidrocoloides, capaces de aportar propiedades viscoelásticas a la masa y emular la funcionalidad del gluten durante el proceso de panificación (Kohlwey et al. 1995).
Por otra parte, diferentes técnicas reológicas, incluyendo la oscilación, la relajación del esfuerzo, mediciones de deformación (creep) y deformación-relajación (creep-recovery) se han utilizado en muchos estudios para investigar las propiedades mecánicas fundamentales de gluten y de las masas de trigo, así como para el establecimiento de las relaciones entre estas propiedades y los atributos de calidad del producto final. Sin embargo, el uso de la reometría para investigar el comportamiento reológico de las masas libres de gluten ha sido limitada (Lazaridou et al. 2007).
Por lo expuesto, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de tres sustitutos del gluten (goma xántica, alginato de sodio y goma guar), solos o combinados, de acuerdo con un diseño de mezclas centroide simplex, sobre las propiedades reológicas de las masas crudas elaboradas a base de harina de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Los ensayos fueron realizados con harina de arroz nativa comercial Kapac (Alimentos Específicos S.A, Buenos Aires, Argentina).
Como sustitutos del gluten se emplearon goma guar y goma xántica adquiridas en un comercio local (Doña Clara, Buenos Aires, Argentina) y alginato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.).

Diseño de mezclas

Se adoptó el diseño centroide simplex, para analizar el posible efecto sinérgico o antagónico de las combinaciones ternarias de los sustitutos del gluten, en panes elaborados a partir de harina de arroz. La cantidad total de sustitutos del gluten utilizada se fijó en 8 g (**Tabla 1**).

Preparación de la masa

Para elaborar las masas se mezclaron en un horno eléctrico (ATMA HP4040, Argentina) a 31 rpm los ingredientes secos: harina de arroz, 384 g; almidón de mandioca, 16 g (Doña Clara, Buenos Aires, Argentina); leche en polvo, 84 g (Svelty Figura, Nestlé, Argentina); huevo en polvo (Ovoprot International S.A., Buenos Aires, Argentina), 10 g; cloruro de sodio, 8 g y sustituto de gluten, 8 g; junto con los líquidos: <agua, 400 ml y aceite de girasol, 40 ml, sin el agregado de leudante. Se seleccionó el programa Nº8 (tiempo de duración 1:30 h), dado que permitió obtener las masas evitando la etapa de cocción.

Reología de las masas

Las propiedades reológicas se determinaron en masas elaboradas sin el agregado de leudante, de acuerdo con otros autores, quienes realizaron ensayos reológicos en masas para panificación, cuyas formulaciones exceptuaron la levadura, ya que la presencia de la misma puede alterar o enmascarar los resultados (Pongjaruvat et al. 2014, Lazaridou et al. 2007).
Las propiedades viscoelásticas de las masas se determinaron mediante ensayos oscilatorios realizados en un

reómetro Paar Physica, modelo MCR 300 (Anton Paar, Graz, Austria) de esfuerzo controlado, provisto de un sistema de platos planos paralelos (diámetro: 3 cm) separados por una distancia de 1 mm, entre los cuales se colocó 10 g de masa. La temperatura del plato inferior fue controlada por un sistema Peltier y un baño termostatizado (Viscotherm VT2, Phaar Physica).
Para evitar la deshidratación de la muestra y la adherencia de la misma al sistema de platos, se sellaron los bordes con aceite de silicona (viscosidad: 290-310 mPa.s, Biopack, Argentina). Como medida adicional para prevenir la evaporación del agua, se utilizó un aro de acrílico transparente con tapas.
En primer lugar se efectuó un **barrido de deformación** entre 0,1-100% a frecuencia (1 Hz) y temperatura (25ºC) constantes, con el propósito de establecer la región viscoelástica lineal (RVL).
Sobre la base de los resultados obtenidos, un valor de deformación incluido en la RVL se utilizó en el ensayo de **barrido de frecuencia,** variando esta entre 1-100 Hz a 25°C. Valores del módulo elástico (G', Pa), módulo viscoso (G'', Pa), y la tangente del ángulo de desfasaje (Tan δ = G''/G') fueron obtenidos para diferentes valores de frecuencia (Hz).
En las **pruebas de deformación-relajación** (creep-recovery), los ensayos de deformación se hicieron aplicando una tensión de corte (τ) constante de 10 Pa, en la RVL, durante 60 s. En la fase de relajación, la tensión se retiró (0 Pa) y la muestra se dejó reposar durante 100 s. Los datos de los ensayos de deformación-relajación se describen en términos de capacitancia elástica o complianza (J, Pa^{-1}), que es la relación entre la deformación lograda y la tensión aplicada (Stanley et al. 1996).

$$J\,(t) = \gamma\,(t) / \tau \quad (1)$$

Donde γ es la deformación lograda y τ es el esfuerzo constante aplicado.
Para analizar la evolución de J a lo largo del tiempo se empleó el modelo de Burgers (Burgers 1935). La ecuación utilizada para el modelado de la zona del "creep" fue:

$$J_c\,(t) = J_0 + J_m\,(1 - e^{-t/\lambda}) + t/\mu_N \quad (2)$$

Donde J_c es la complianza en la zona de creep, J_0 es la complianza instantánea, J_m y λ son la complianza y tiempos de retardo promedio y μ_N es la viscosidad newtoniana.
En la fase de recuperación (recovery) se realizó un ajuste con la misma ecuación de Burgers que en este caso, al no existir viscosidad, se puede representar por medio de la siguiente expresión:

$$J_r\,(t) = J_{max} - J_0 - J_m\,(1 - e^{-t/\lambda}) \quad (3)$$

Donde J_r es la complianza en la zona del recovery, J_{max} es la máxima deformación, J_0 es la deformación instantánea, J_m y λ son la complianza y tiempos de retardo promedio.
Los ensayos oscilatorios de barrido de deformación y barrido de frecuencias y el ensayo de deformación-relajación se hicieron para cada masa, correspondientes al diseño de mezclas, por duplicado.

Análisis estadístico

El análisis del diseño de mezcla y las diferencias significativas entre los parámetros característicos de las muestras (determinadas por análisis de varianza simple, ANOVA) se realizaron utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion versión XVI (Statistical graphics Corporation, EE. UU.), comparando las medias por el test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD), con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades reológicas de las masas

Se investigó el efecto de los diferentes sustitutos del gluten (xántica: GX, alginato de sodio: AL y goma guar: GG), aplicados individualmente o combinados de a pares o bien en mezcla ternaria, en formulaciones

elaboradas a base de harina de arroz.

Ensayos oscilatorios

En la **Tabla 1** se exhibe la región viscoelástica de las masas de pan correspondientes al diseño experimental. La goma xántica posee un mayor rango de amplitud en comparación con la goma guar y el alginato de sodio, como único ingrediente de sustitución de gluten en la masa. Cabe indicar que las mezclas binarias se potenciaron alcanzando valores de deformación de 7,28-8,76%. Por último, la mezcla ternaria (GX+AL+GG) presentó una deformación mayor a las otras mezclas, lo cual permite trabajar a valores altos de amplitud sin destruir la masa del pan. Los valores de RVL de este trabajo fueron similares a los informados por Lazaridou et al. (2007) y Sivaramakrishnan et al. (2004) quienes estudiaron masas para panificados sin gluten.

Tabla 1. Región viscoelástica lineal (RVL) de las masas de pan, en función del diseño de mezclas.

Mezclas	Sustituto de gluten (g)			RVL[1] (Deformación %)
	GX	AL	GG	
1	8	0	0	0,1 - 8,34
2	0	0	8	1 - 5,16
3	0	8	0	1 - 4,7
4	4	0	4	0,1 - 8,76
5*	2,67	2,67	2,67	1 - 17,8
6	0	4	4	0,1 - 7,28
7	4	4	0	0,1 - 7,95

* Punto central del diseño experimental por triplicado.
[1]Barrido de deformación entre 0,1-100% a frecuencia (1 Hz) y temperatura (25ºC) constantes.
GX: Goma xántica; AL: Alginato de sodio; GG: Goma guar.

La variación de los módulos de almacenamiento (G'), de las masas para la elaboración de pan correspondientes al diseño de mezclas, en función de la frecuencia, se visualiza en la **Figura 1**. En general, se aprecia la independencia de G' en un amplio rango de barrido (frecuencia menor a 50 Hz).

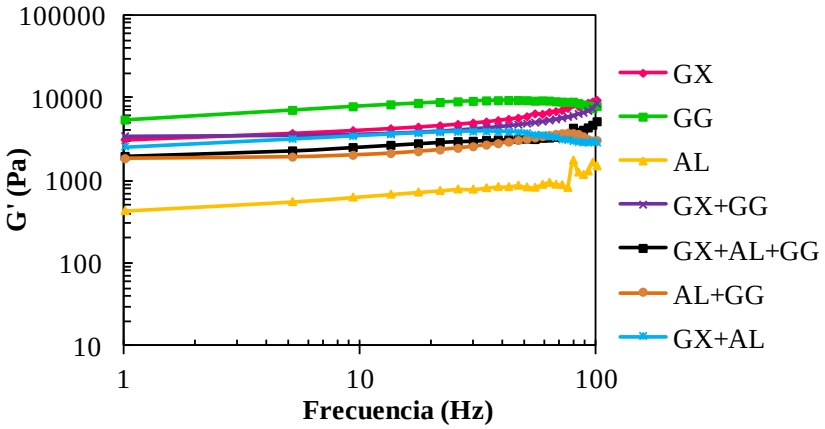
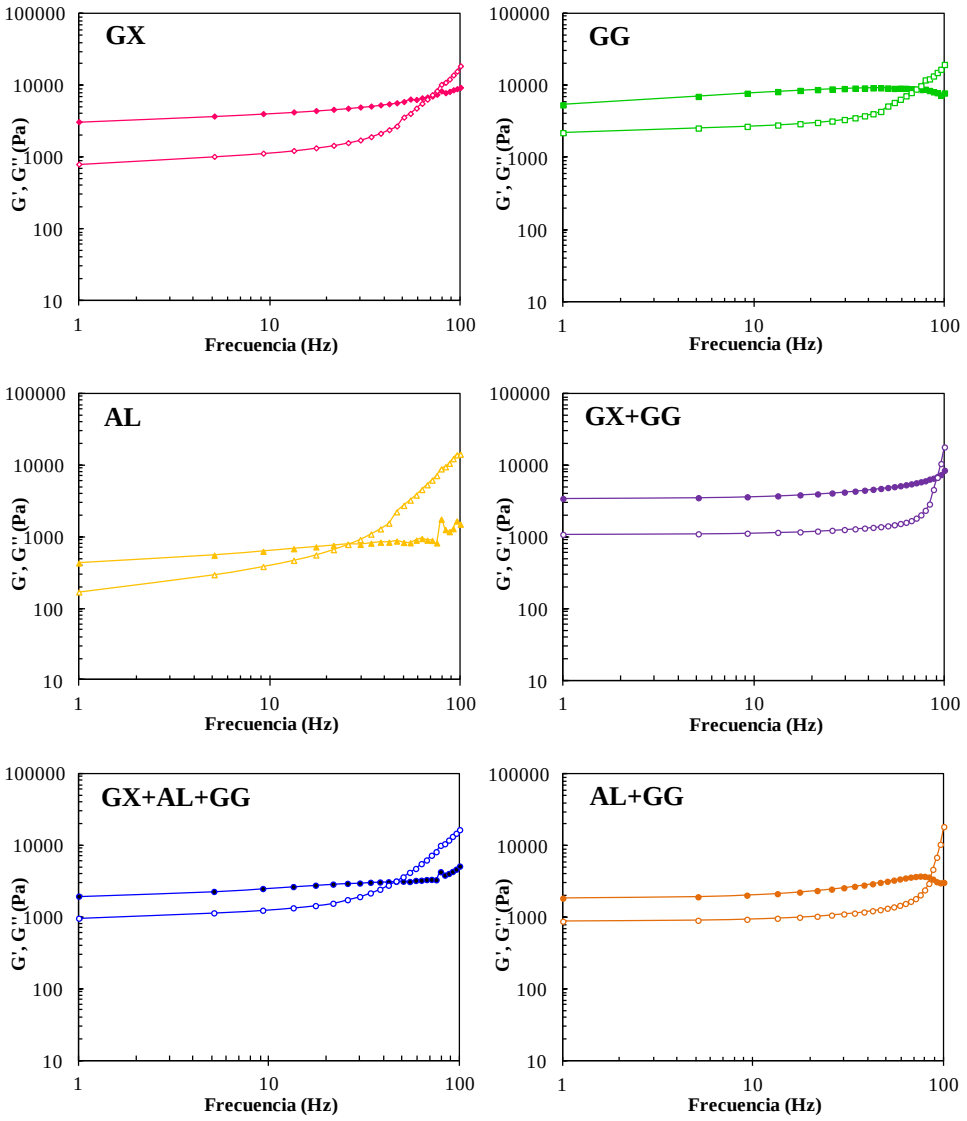


Figura 1. Módulo de almacenamiento (G') de las masas para pan en función del diseño de mezclas (GX: goma xántica, AL: alginato de sodio, GG: goma guar) a 25°C y deformación constante (γ = 1%).

La formulación con goma guar presentó mayor carácter elástico que los demás sustitutos del gluten empleados individualmente o combinados; mientras que el alginato de sodio exhibió los menores valores de G'. Se observaron comportamientos similares en el caso de la goma xántica y la mezcla de gomas (GX+GG). Además, se evidenció que la presencia de alginato de sodio en las mezclas (binaria o ternaria) provocó una disminución del carácter elástico de la masa.

La **Figura 2** muestra los espectros mecánicos dinámicos del diseño de mezclas, los cuales revelan el carácter elástico (G'>G") de las masas para pan sin gluten, elaboradas a base de harina de arroz en coincidencia con lo encontrado en la bibliografía (Sivaramakrishnan et al. 2004, Gujral y Rosell 2004). Se puede observar, a través de los valores de los módulos dinámicos de todas las masas, que el comportamiento viscoelástico corresponde a la llamada meseta de relajación, donde los valores de G' son mayores que los valores de G" prácticamente en todo el rango de frecuencias. Se indica además, que el módulo viscoso presenta una tendencia creciente más evidente en la zona de alta frecuencia, llegando a superar al módulo elástico. Todas las mezclas evaluadas exhibieron un valor de frecuencia en el que coinciden ambos módulos viscoelásticos (**Tabla 2**). Estos resultados revelaron que la presencia de alginato de sodio le da un carácter viscoso a la masa a partir de un valor de frecuencia relativamente bajo (26 Hz). Conjuntamente se evidenció una

disminución significativa en el valor de los módulos en el punto en donde se igualan (tan δ = 1), en comparación con los otros sustitutos.
Por otra parte, las combinaciones de gomas xántica-guar (GX+GG) y goma guar-alginato de sodio (AL+GG) permitieron mantener el carácter elástico prácticamente en todo el rango de frecuencia, como se desprende de los elevados valores de frecuencia (91,8 Hz y 84,9 Hz, respectivamente) para el punto de coincidencia.



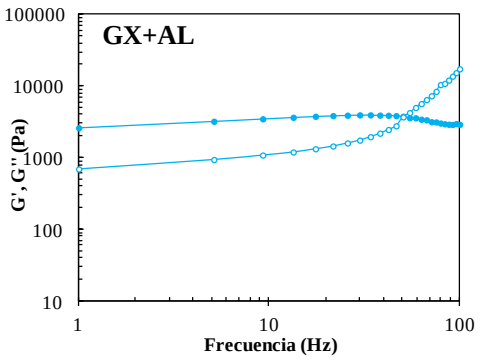


Figura 2. Espectros mecánicos dinámicos de las masas para pan, a 25°C y deformación constante (γ = 1%) en función del diseño de mezclas (GX: goma xántica, AL: alginato de sodio, GG: goma guar).

Tabla 2. Valores de la frecuencia en correspondientes a tan δ = 1 en función del diseño de mezclas.

Mezclas	**Sustituto de gluten**	**G' = G"** (Pa)	***f*** (Hz)
1	GX	6840	69,05
2	GG	8890	71,1
3	AL	788	25,8
4	GX+GG	6920	91,8
5*	GX+GG+AL	3170	46,4
6	AL+ GG	3490	84,9
7	GX+AL	3650	50,5

* Punto central del diseño experimental por triplicado.
GX: Goma xántica; AL: Alginato de sodio; GG: Goma guar.

Ensayos de deformación-relajación

Para caracterizar la deformación elástica retardada que experimentan las masas, hasta establecerse un flujo newtoniano en el sistema por la aplicación de una tensión constante, y como se recuperan una vez que cesa la aplicación del esfuerzo, se llevaron a cabo ensayos de "creep-recovery" dentro de la RVL. Las curvas obtenidas (**Figura 3**) mostraron un comportamiento viscoelástico típico de las masas de pan sin gluten, similares a las obtenidas por otros autores (Sivaramakrishnan et al. 2004, Lazaridou et al. 2007).

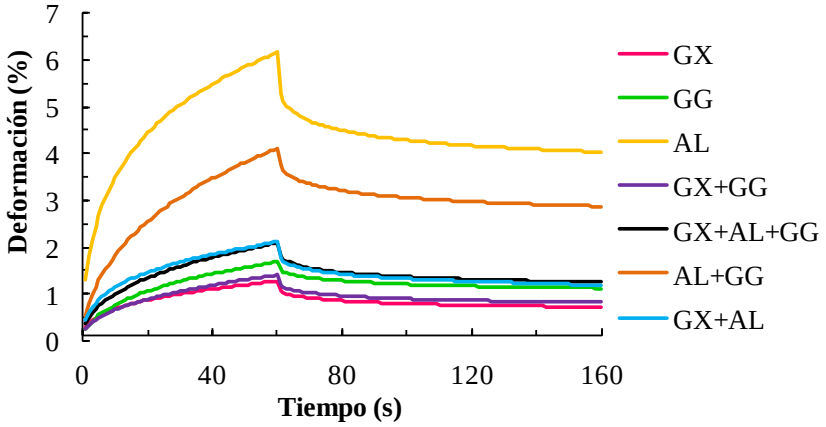


Figura 3. Curvas experimentales del ensayo de deformación-relajación de las masas para pan en función del diseño de mezclas (GX: goma xántica, AL: alginato de sodio, GG: goma guar).

La masa que menos resistencia ofreció fue la elaborada con alginato de sodio, mientras que las que ofrecieron mayor resistencia fueron las masas con goma xántica y la mezcla de goma xántica y goma guar; seguidas de la masa con goma guar y la mezcla de goma xántica y alginato de sodio, junto con la mezcla ternaria (GX+AL+GG). Valores intermedios de deformación se obtuvieron con la mezcla de goma guar y alginato de sodio. Una mayor resistencia a la deformación puede asociarse con una estructura más firme y una miga de pan menos compacta. La masa que presentó una mayor deformación (AL) no posee la capacidad de ocluir gas durante la fermentación. Por el contario, las masas que mostraron la menor deformación (GX y GG) poseen la capacidad de retener gas y se corresponden con un mayor volumen de pan, tal como fue probado en un trabajo previo (Cajas Locke et al. 2015).

A partir de estos resultados y empleando el modelo de Burgers (ec. 2 y 3), se obtuvieron los valores de los

parámetros del ajuste, que se informan en la **Tabla 3**. La buena correspondencia entre los valores experimentales y los predichos se puede visualizar en los coeficientes de determinación ($R^2 > 0,99$).
Durante la fase de deformación (creep), las formulaciones con alginato de sodio presentaron los mayores valores de la complianza instantánea (J_0) y de la complianza retardada (J_m) y los menores valores fueron para las gomas xántica y guar. A su vez, estos valores resultaron del mismo orden de magnitud que los de las masas para panificación libres de gluten informados por Lazaridou et al. (2007). Para la fase de relajación (recovery) se obtuvieron resultados que se corresponden con los obtenidos en la fase de deformación.

Tabla 3. Parámetros del modelo de Burgers (ecs. 2 y 3)

N°	Mezcla	Fase "Creep"				
		J_0 ($Pa^{-1}.10^{-4}$)	J_m ($Pa^{-1}.10^{-4}$)	λ (s)	η_N (Pa.s)	R^2
1	GX	$2,02^{ab}$	$4,92^{ab}$	$6,46^{a}$	99486^{d}	$0,9992^{c}$
2	GG	$1,42^{a}$	$6,67^{a}$	$7,81^{c}$	65896^{b}	$0,9994^{de}$
3	AL	$8,96^{d}$	$28,48^{d}$	$6,53^{a}$	23601^{a}	$0,9989^{a}$
4	GX + GG	$1,67^{a}$	$4,96^{ab}$	$6,98^{b}$	78495^{c}	$0,9993^{d}$
5*	GX + AL + GG	$2,42^{b}$	$7,82^{b}$	$7,09^{b}$	54129^{b}	$0,9992^{c}$
6	AL + GG	$3,12^{c}$	$16,18^{c}$	$7,90^{d}$	26482^{a}	$0,9994^{e}$
7	GX + AL	$3,37^{c}$	$8,53^{b}$	$6,70^{a}$	62663^{b}	$0,9991^{b}$
N°	**Mezcla**	**Fase "Recovery"**				
		J_0 ($Pa^{-1}.10^{-4}$)	J_m ($Pa^{-1}.10^{-4}$)	λ (s)	J_{max} ($Pa^{-1}.10^{-4}$)	R^2
1	GX	$2,57^{a}$	$2,95^{a}$	$26,49^{bc}$	$1,27^{a}$	$0,9929^{bc}$
2	GG	$2,21^{a}$	$3,39^{a}$	$26,12a^{bc}$	$1,69^{b}$	$0,9931^{bc}$
3	AL	$10,78^{e}$	$10,40^{d}$	$25,79^{ab}$	$6,17^{d}$	$0,9907^{a}$
4	GX + GG	$2,57^{a}$	$3,23^{a}$	$25,72^{a}$	$1,40^{a}$	$0,9923^{b}$
5*	GX + AL + GG	$3,63^{b}$	$4,74^{b}$	$26,15^{ab}$	$2,09^{b}$	$0,9931^{c}$
6	AL + GG	$5,00^{d}$	$7,38^{c}$	$27,28^{c}$	$4,11^{c}$	$0,9924^{bc}$
7	GX + AL	$4,27^{c}$	$4,87^{b}$	$28,60^{c}$	$2,11^{b}$	$0,9924^{b}$

* Punto central del diseño experimental por triplicado.
GX: Goma xántica; AL: Alginato de sodio; GG: Goma guar.
Valores en la misma columna con la misma letra no difieren significativamente ($p<0,05$).

CONCLUSIONES

Los ensayos reológicos evidenciaron los efectos sinérgicos presentes en combinaciones de sustitutos de gluten. Los resultados señalaron que las masas con menor resistencia, y por lo tanto menor capacidad para producir una estructura firme y retener gas, fueron las elaboradas con alginato de sodio, mientras que las que ofrecieron mayor resistencia fueron las masas con goma xántica y la mezcla goma xántica-goma guar, seguidas de la masa con goma guar, las mezclas de goma xántica-alginato de sodio y la mezcla ternaria. Valores intermedios de deformación se obtuvieron con la mezcla goma guar-alginato de sodio. A su vez, los datos experimentales ajustaron satisfactoriamente al modelo de Burgers, siendo las deformaciones mayores en el caso de la masa con alginato de sodio. El empleo de los distintos hidrocoloides, como sustitutos del gluten en la elaboración de masas para panificación a base de harina de arroz, permitió obtener comportamientos viscoelásticos diferenciados. Mediante el diseño de mezcla propuesto fue posible identificar las combinaciones de sustitutos de gluten más convenientes para la elaboración de pan de molde de calidad.

BIBLIOGRAFÍA

Burgers, JM. 1935. First report on viscosity and plasticity. Nueva York: Nordemann publishing company.

Cajas Locke JE, Loubes MA, Tolaba MP. 2015. Evaluación de sustitutos de gluten en la formulación de pan de molde a base de harina de arroz. En Libro de Actas del XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XV CYTAL). Buenos Aires, Argentina.

Gujral HS, Rosell MC. 2004. Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. Food Research International, 37: 75-81.

Kohlwey DE, Kendall JH, Mohindra RB. 1995. Using the physical properties of rice as a guide to formulation. Cereal Food World, 40(10): 728-732.

Lazaridou A, Duta D, Papageorgiou M, Belc N, Biliaderis CG. 2007. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. Journal of Food Engineering, 79:1033-1047.

Osborne T. 1907. Proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution Washington, 84: 1-119.

Peña AS, Rodrigo L. 2013. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca. Barcelona: Omnia Publisher SL.

Pongjaruvat W, Methacanon P, Seetapan N, Fuongfuchat A, Gamonpilas C. 2014 Influence of pregelatinised tapioca starch and transglutaminase on dough rheology and quality of gluten-free jasmine rice breads. Food Hydrocolloids, 36: 143-150.

Prandi B, Mantovani P, Galaverna G, Sforza S. 2014. Genetic and environmental factors affecting pathogenicity of wheat as related to celiac disease. Journal of Cereal Science, 59: 62-69.

Sivaramakrishnan HP, Senge B, Chattopadhyay PK. 2004. Rheological properties of rice dough for making rice bread. Journal of Food Engineering, 62: 37-45.

Stanley DW, Stone AP, Tung MA. 1996. Handbook of food analysis. New York: Marcel Dekker, Inc.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 20020130100442BA) y PME-2006-01685.

Caracterización de la maduración de quesos gouda de elaboración regional a través del seguimiento de la lipólisis

Carrión Sad, Y.[1], Pereyra, M.A.[1, 2], Cantalupi, AM [1]Mignino L.A.[1*]

(1) Área de Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP, Balcarce.
(2) Laboratorio de Bioquímica Vegetal y Microbiana, Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP.
lomignino@hotmail.com

RESUMEN
Se estudió el avance de la lipólisis durante la maduración de un queso tipo Gouda elaborado en la cuenca lechera Mar y Sierras. Los tiempos de muestreo fueron: 0, 7, 14, 21, 28 días. Los parámetros fisicoquímicos analizados fueron: humedad, pH, acidez total y soluble y el perfil de ácido grasos libres (AGL). Los datos obtenidos fueron sometidos a un ANOVA y test específicos. La humedad presentó una caída significativa ($p<0,05$) a partir de los 14 días, el pH disminuyó a lo largo de todo el tiempo de maduración, llegando a valores finales de 5. Tanto la acidez total como la soluble aumentaron significativamente ($p<0,05$) con función del tiempo. En el perfil de AGL fueron detectados 8 ácidos grasos, donde Oleico, Palmítico y Esteárico fueron los mayoritarios. La concentración de los AGL aumentó conforme avanzó el tiempo de maduración, siendo detectado este aumento a partir del séptimo día. Los parámetros fisicoquímicos asociados a la maduración, evolucionaron según lo esperado para este tipo de quesos. Estos cambios podrían ser relacionados con las características sensoriales, específicamente con las vinculadas a aroma y sabor, que podrían brindar particularidades regionales al queso de pasta semidura de la Cuenca Mar y Sierras.

Palabras claves: queso regional, maduración, lipólisis, valor agregado

ABSTRACT
The evolution of lipolysis during ripening of Gouda cheese from dairy basin "Mar y Sierras" was evaluated. The ripening and sampling times were: 0, 7, 14, 21, 28 days. The evaluated physico-chemical parameters were: moisture content, pH, total and soluble acidity, and free fatty acid profile (FFA). The obtained results were evaluated by ANOVA and specific tests. The moisture content showed a significant drop ($p<0.05$) from day 14, while the pH decreased along all the ripening progress, reaching final values of 5. Both total and soluble acidity increased significantly ($p<0.05$) along the ripening. In FFA profile, 8 fatty acids were detected, being Oleic, Palmitic and Estearic acids the major ones. The FFA concentration increased as the ripening advanced, being this detected from the seventh day. The physico-chemical parameters associated with ripening evolved as expected for this kind of cheese. These changes could be related to the sensory characteristics, specifically those related to aroma and flavor that could provide regional particularities to semi-hard cheese from dairy basin "Mar y Sierras".

Keyswords: regional cheese, ripening, lipolysis, value added

INTRODUCCIÓN
En Argentina se elaboran más de 45 variedades de quesos descriptas en el Código Alimentario Argentino, algunas de las cuales, presentan características diferentes a la de sus orígenes europeos debido a la materia prima utilizada y a las distintas condiciones de elaboración. El proceso de elaboración de quesos es tan variable, que se ha propuesto considerar a los quesos regionales como patrimonio cultural de la región, realzando así su valor de origen. En la elaboración, se considera a la etapa de maduración como una de las más importantes debido a las transformaciones fisicoquímicas y enzimáticas que ocurren en la misma. Los principales procesos bioquímicos que ocurren se pueden resumir en: a) metabolismo de lactosa residual,

lactato y citrato, b) degradación de proteínas y de péptidos y transformación de aminoácidos (proteólisis), c) degradación de la grasa y posterior transformación de ácidos grasos libres (AGL) (lipólisis). A partir de estos procesos se producen importantes modificaciones fisicoquímicas que determinan las características finales de cada variedad de queso, como textura, color o *flavor*. Todo ello depende a su vez de las características de la leche, del proceso de elaboración y de las condiciones de maduración (El Soda y Pandian 1991, Chavarri Díaz de Cerio 1999).

La hidrólisis enzimática de los triacilglicéridos (que constituyen más del 98% de la grasa del queso) es la transformación bioquímica más importante que sufre la grasa durante la maduración del queso. El resultado es la producción de AGL y bajas concentraciones de mono- y diacilglicéridos. Los AGL y otros productos formados en etapas posteriores de degradación como alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y lactonas, son los componentes principales del aroma y el sabor característicos de cada queso (Juárez *et al*. 2001). El grado de lipólisis de un queso puede ser considerado como un indicador de maduración, determinándose mediante técnicas cromatográficas. La cromatografía de gases se utiliza en forma generalizada para determinar el contenido en triacilglicéridos y sus ácidos grasos y de AGL durante las distintas etapas en la maduración de un queso (Juárez *et al*. 2001).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el avance de la lipólisis durante la maduración de un queso tipo Gouda elaborado en un establecimiento ubicado en la cuenca lechera Mar y Sierras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron muestras de queso de pasta semidura provenientes de una empresa ubicada en la Cuenca Mar y Sierras, ciudad de Tandil, de elaboración artesanal. Los quesos fueron madurados en la planta elaboradora dentro de cámaras, cuyas condiciones de temperatura y humedad fueron controladas: 12°C y 80% de HR. Luego fueron trasladados desde la planta elaboradora hasta el Laboratorio de Calidad y Tecnología de Post-cosecha y Alimentos de la Estación Experimental Balcarce, INTA, donde se les realizaron los análisis. Los tiempos de maduración y muestreo fueron a los 0, 7, 14, 21, 28 días. El muestreo de los quesos se realizó según Norma FIL-IDF 50C: 1995 (International Dairy Federation - Federación Internacional de Lechería). Se tomaron muestras de dos hormas de queso para cada tiempo de análisis y de cada horma se analizaron 3 repeticiones. Los parámetros fisicoquímicos analizados fueron: humedad, pH, Acidez total y soluble y el perfil de AGL.

Humedad

Se determinó por secado de la muestra en estufa a 102 ± 1ºC hasta pesada constante, de acuerdo a la metodología de la Federación Internacional de Lechería (ISO 5534/IDF 004 2004).

Determinaciones de pH

Se realizó mediante la utilización de un pH-metro (Orion Research Incorporated, Estados Unidos), provisto con un electrodo combinado (vidrio y calomel). Se preparó una suspensión de 10 g de queso y 10 mL de agua destilada y se realizó la lectura por inmersión del electrodo en dicha suspensión (Fox y McSweeney 2004).

Acidez total

La determinación de la acidez total titulable se realizó en base a la reacción de neutralización de los ácidos orgánicos débiles presentes, con una base fuerte en presencia de fenolftaleína como indicador. Se valoró por el método Dornic (Afnor 1980).

Acidez soluble

Se realizó de acuerdo a la técnica descripta por Meyer *et al.* (1992), en base a una reacción de neutralización, utilizando fenolftaleína como indicador. El resultado fue expresado en °Dornic.

Determinación de los AGL

Los AGL y los triacilglicéridos presentes en la grasa extraída, fueron separados mediante el uso de columnas creadas a partir de buretas de vidrio usando sílica gel, como fase estacionaria. Se siguió el procedimiento descrito por Antequera *et. al.* (1994). Para la separación, se colocaron en la columna 100 mg de grasa

disueltos en 1 mL de cloroformo. Posteriormente, se eluyó la fracción de lípidos neutros con 6 mL de una mezcla de Cloroformo: Isopropanol (2:1 v/v), la cual fue recolectada en una probeta graduada. Finalmente, los AGL se eluyeron con 5 mL de una disolución al 2% (v/v) de ácido acético en éter etílico con una velocidad de flujo de 0,40 mL min^{-1}. Estos últimos mililitros (conteniendo los AGL) se recolectaron y guardaron en viales para su posterior identificación cromatográfica. Posteriormente, los AGL fueron metilados siguiendo la técnica propuesta por Sukhija y Palmquist (1988).

Análisis Cromatográfico

La composición acídica de las muestras fue determinada mediante cromatografía gaseosa (GC) con un equipo Shimadzu GC-2014 (Kyoto, Japón). Las temperaturas del inyector y el detector (FID) fueron de 240 y 300ºC, respectivamente, mientras que la de la columna fue de 210°C. Se inyectó 1 µL de muestra en la columna (DB23 de 60 m) y el gas portador (N_2) fue mantenido a una presión constante de 100 kPa. Los cromatogramas fueron obtenidos y procesados mediante el software Shimadzu GC solution.

Análisis Estadístico

Se empleó un diseño completo aleatorizado (DCA). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Tukey, con una significancia del 5%) a través del ajuste de modelos lineales para cada variable, en donde se consideró el efecto del tiempo de maduración y las interacciones para cada queso. Los datos se analizaron con el programa estadístico InfoStat, versión 2015 (Di Rienzo *et al.* 2015).

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de humedad

La humedad es un parámetro muy importante en el proceso de la maduración del queso, ya que afecta el crecimiento y la actividad de los microorganismos (Scott 1991) y favorece la solubilización y difusión de las enzimas y de los productos metabólicos de los procesos bioquímicos. La humedad tendió a disminuir a lo largo de la maduración del queso. Esta variación es fundamental en este período, puesto que influye en gran medida en los procesos degradativos que ocurren en el interior del producto. Por lo anterior, los quesos con mayor humedad maduran más rápido que los más secos (Alais, 1985). En la **Figura 1** se muestran los valores de humedad estudiados a lo largo de la maduración

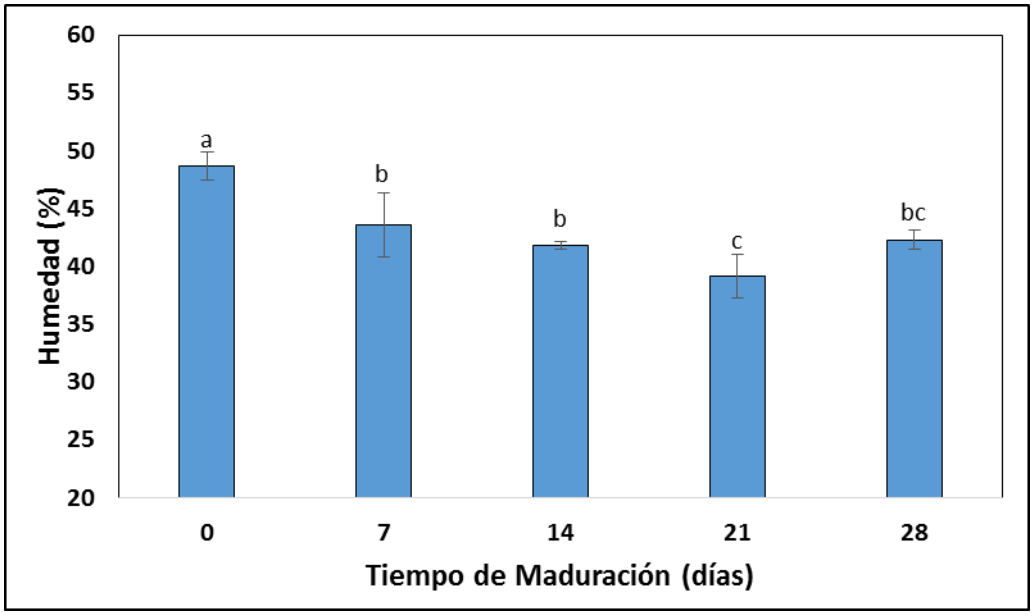


Figura 1. Valores de Humedad del queso, en función del tiempo de maduración. Se representan los valores promedio ± DS (n=6)

* Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los valores de humedad

Se observó una disminución de la humedad, con una caída significativa a los 21 días de maduración ($p<0,05$) que se mantuvo hacia el final de la misma. Esta tendencia a lo largo del tiempo de maduración, es acorde con uno de los procesos de naturaleza física que ocurre en este período, la evaporación del agua (Reinheimer *et al*. 2004). Este comportamiento también fue observado en un queso semiduro, tipo Pategrás, donde la caída en el contenido de humedad fue similar, alcanzando a los 25 días de maduración, en promedio 40,41%

(Ramonda 2009).
Finalmente, los valores obtenidos en el final de la maduración (42,29% ± 0,86) se encuentran dentro del intervalo exigido por el C.A.A para este tipo de queso (entre 36 y 45,9%).

pH

El pH afecta a la textura y el sabor del queso e indirectamente afecta la actividad de las enzimas importantes para este proceso. A su vez, en el caso del coagulante, afecta la retención de la enzima en la cuajada durante la fabricación (McSweeney 2004).

En la **Figura 2**, se pueden observar los valores de pH obtenidos para los quesos estudiados en función del tiempo de maduración.

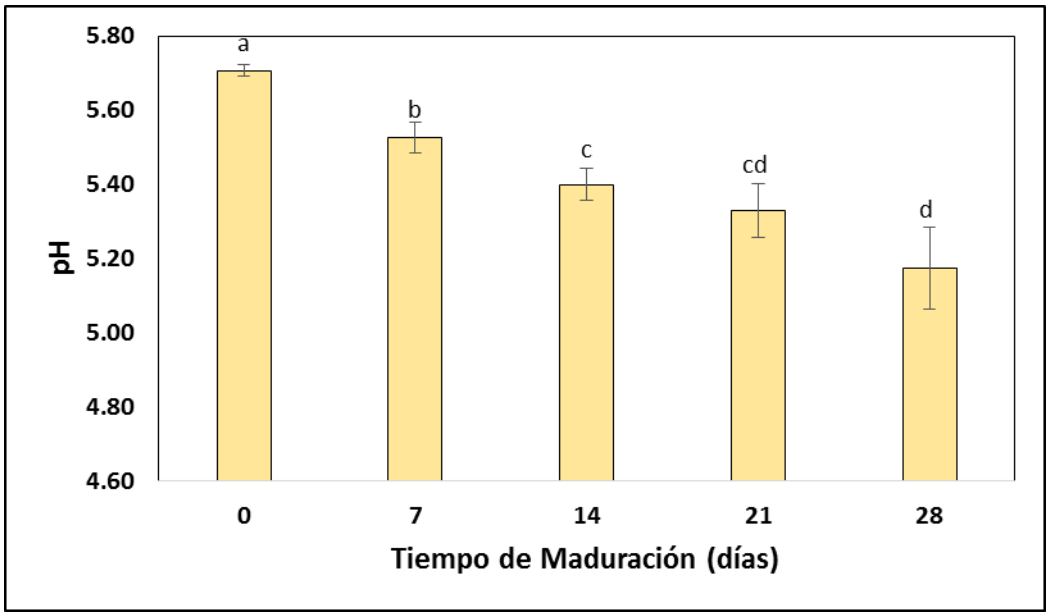


Figura 2. Valores de pH en función del tiempo de maduración. Se representan los valores promedios ± DS (n=6)

* Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los valores de pH en función del tiempo de maduración.

Se observó una disminución total del pH del 11% en el período muestreado, con una caída significativa ($p<0,05$) hasta los 14 días de maduración, llegando a valores finales de 5,20. Según Brito *et al.* (2002) en sus investigaciones para queso Gouda industrial, los rangos de pH para un queso madurado son entre 5,2 a 5,4. Por otro lado, Van Den Berg *et al.* (2004) menciona que el rango de pH para el queso Gouda puede estar entre 4,9 a 5,6. En este sentido el pH en los quesos analizados coincidirían con los obtenidos por estos autores. Para algunos tipos de quesos Van Den Berg *et al*. (2004) indicaron que cuanto mayor es el contenido de agua, existirá un mayor contenido de lactosa, o su equivalente convertido en ácido láctico, que está presente en el queso, y por lo tanto más bajo será el pH final. De la misma manera, otros autores como Fox *et al.* (1996), coinciden señalando que a mayor contenido de humedad en la cuajada mayor será la retención de lactosa y por lo tanto mayor proporción de lactato respecto a las sustancias tampones, lo que implica un menor pH. En función de lo mencionado, y si bien no está demostrado para quesos de pasta lavada como el Gouda, los valores de pH bajos alcanzados en los quesos evaluados, podrían ser en parte consecuencia del mayor %humedad observado al inicio de la maduración.

Acidez total y soluble

La acidificación de la cuajada juega un efecto crucial sobre las propiedades del queso como son su pH, humedad, textura, vida de anaquel, gusto y aroma (Pastorino *et al.*2003). En la **Figura 3** se presentan los resultados obtenidos de Acidez total y soluble, respectivamente, para las muestras de queso, estudiadas a lo largo de la maduración (Sousa, 2015).

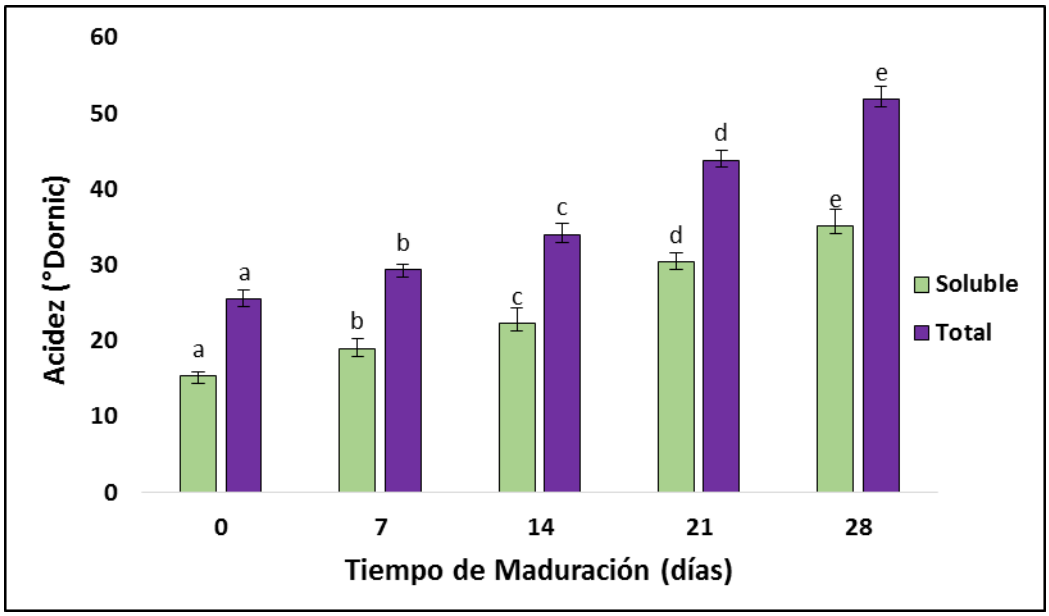


Figura 3. Valores de Acidez total y soluble en función del tiempo de maduración. Se representan los valores promedio ± DS (n=6).

* Diferentes letras minúsculas entre barras de igual color, indican diferencias significativas entre los valores de Acidez Total y soluble en función del tiempo de maduración.

Como se aprecia en la **Figura 3**, se verificó un ascenso significativo ($p<0,05$) de la acidez titulable a lo largo de la maduración. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Pinho *et al.* (2004), quien observó un incremento de la acidez durante el período de almacenamiento, para quesos de leche de oveja madurados durante 60 días. La acidez es un factor esencial en la conservación de alimentos. En aquellos que contienen alta acidez, los microorganismos patógenos presentan pocas posibilidades de sobrevivir (Steinkraus 2002).

En cuanto a la Acidez soluble, se observó un aumento significativo ($p<0,05$) para todos los tiempos de maduración evaluados.

Analizados en conjunto los resultados obtenidos para pH, acidez total y soluble, se puede confirmar que a medida que disminuyen los valores de pH en ambos quesos, aumentan los contenidos en acidez total y soluble.

Ácidos grasos libres

Los AGL, son compuestos que se desarrollan durante la maduración de los quesos y contribuyen a las características finales de las distintas variedades. Son precursores de una serie de compuestos relacionados con el *flavor* (Muset y Rodriguez 2000). En la **Figura 4**, se presenta el perfil de AGL que caracterizó al queso tipo Gouda Regional, para los distintos tiempos de maduración.

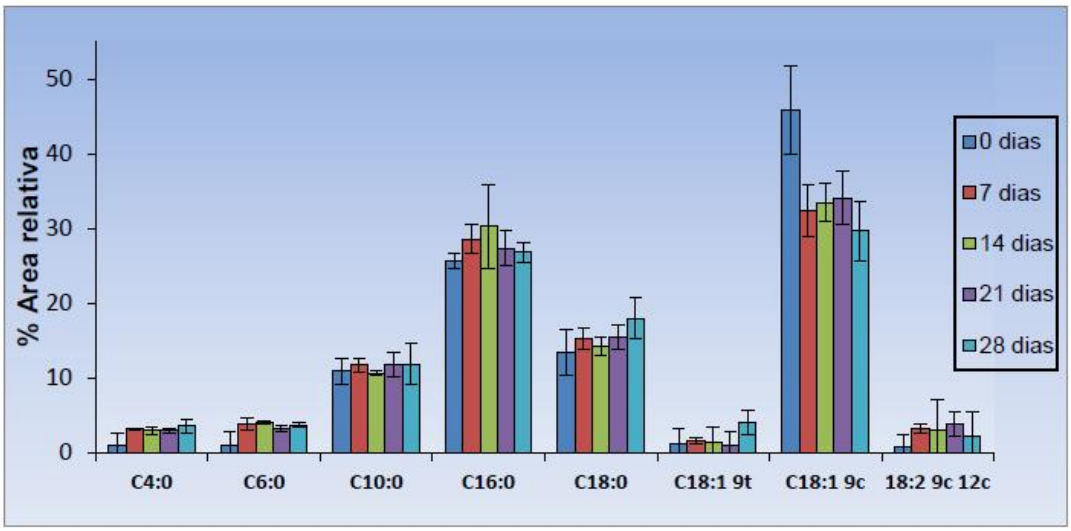


Figura 4. Perfil de Ácidos grasos libres del queso en función del tiempo de maduración. Se representan los valores promedio ± DS (n=6).

El perfil de AGL que caracterizó a los quesos al final de su maduración, se encuentra conformado por los ácidos grasos que se listan en la tabla.

Tabla 1. Perfil de AGL detectados a los 28 días de maduración. Se representan valores promedios ± DS, n=6.

Ácidos Grasos	**Abreviatura**	**%Área relativa**
Acido Butírico	(C4:0)	3,56 ± 0,98
Acido Caproico	(C6:0)	3,68 ± 0,30
Acido Cáprico	(C10:0)	11,89 ± 2,78
Acido Palmítico	(C16:0)	26,83 ± 1,33
Acido Esteárico	(C18:0)	17,97 ± 2,72
Acido Elaídico	(C18:1 9t)	4,11 ± 1,60
Acido Oleico	(C18:1 9c)	29,73 ± 4,01
Acido Linoleico	(C18:2 9c 12c)	2,22 ± 3,15

Los AGL liberados en mayor proporción durante la maduración del queso Regional, fueron: C18:1 9c, C16:0 y C18:0, todos ellos ácidos grasos de cadena larga. Los AGL liberados durante la lipólisis, especialmente los de cadena corta y media, aunque están presentes en baja concentración, contribuyen al aroma del queso, debido a que presentan umbrales de percepción bajos y brindan notas sensoriales características (McSweeney y Sousa 2000, Urbach 1993). Así, se ha considerado que el ácido butírico (C4:0) produce aromas rancios, el ácido caproico (C6:0) sabor y aroma picantes y el ácido caprílico (C8:0) gusto a cera, a cabra, a jabón y frutado, entre otras descripciones (Collins *et al*. 2004). Los AGL de cadena larga (más de 14 átomos de carbono) juegan un papel menor en el *flavor* de los quesos debido a sus altos umbrales de percepción (Molimard y Spinnler1996). Dependiendo de sus concentraciones y umbrales de percepción, los AGL volátiles pueden tener un impacto positivo o negativo en el aroma y sabor de los quesos. Los AGL son, además, importantes precursores de varios compuestos volátiles que contribuyen al aroma (McSweeney y Sousa 2000, Collins *et al*. 2004). Cabe aclarar que el nivel de lipólisis en quesos varía considerablemente entre distintas variedades. En quesos madurados internamente por bacterias (Cheddar, Gouda, Pategrás Argentino) el nivel es bajo (<2000 mg/Kg de queso), de manera que una lipólisis excesiva resultaría indeseable. Incluso, quesos con niveles moderados de AGL pueden ser considerados rancios por algunos

consumidores (Collins *et al*. 2004).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos asociados a la maduración, se pudo comprobar que los mismos fueron evolucionando como era esperado para este tipo de queso. El contenido de humedad presentó una disminución a lo largo de ese período, y los valores obtenidos resultaron acordes a los establecidos para dicha variedad, según el C.A.A. En cuanto al pH, éste experimentó un descenso a lo largo de la maduración. A su vez, se observó que a medida que disminuyeron los valores de pH, aumentaron los contenidos en acidez total y soluble.

En función del análisis del perfil de AGL del queso de elaboración regional, se evidencia que los mismos aumentaron conforme avanzó el tiempo de maduración, a partir del séptimo día.

Los ácidos grasos liberados que caracterizaron al queso Regional al final de la maduración fueron los de cadena corta y media, siendo mayoritarios el Oleico, el Palmítico y el Esteárico.

BIBLIOGRAFIA

Afnor (Association Française de Normalisation). 1980. Lait. Détermination de la teneur en lactose. NF V 04-213. En: AFNOR (ed.), Recueil de norms françaises. Laits et produits laitiers. Méthodesd' analyse. Paris: AFNOR. Paris La Défense. pag 225.

Antequera T, García C, López C, Ventanas J, Asensio MA, Córdoba JJ. 1994. Evolución de distintos parámetros fisicoquímicos durante la elaboración de jamones ibéricos a partir de cerdos Ibéricos (100%) e Ibéricos x Duroc (50%). Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 34: 178-200.

Brito C, Niklitschek L, Molina LH, Molina I. 2002. Evaluation of mathematical equations to predict the theorical yield of chilean gouda cheese. International Journal of Dairy Tecnology 55: 32-39.

Chávarri Díaz de Cerio F. 1999. Lipólisis en el queso Idiazabal: efecto de la época de elaboración, del cultivo iniciador, de la pasteurización y del tipo de cuajo. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco. Vitoria-Gasteiz, España. 163 p.

Código Alimentario Argentino. 2014. Quesos. Alimentos Lácteos. v.8. Art. Nº 605. [en línea] <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf> [consulta: 15 junio 2015]

Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG. 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. En: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T.; Guinee, T. (eds.) *Cheese*: Chemistry, Physics and Microbiology. v.1: General Aspects. Estados Unidos: Academic Press. pag389.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2015. InfoStat, Software Estadístico. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

El Soda M, Pandian S. 1991. Recent developments in accelerated cheese ripening. Journal of Dairy Science. 74: 2317-2335.

FIL-IDF.1981. Bulletin of the IDF N° 141. Catalogue of cheeses. 40 p.

Fox PF, Mcsweeney PHL. 2004. Cheese: Methods of Chemical Analysis. En: Fox, P. F. eds. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. v1. General Aspects. Estados Unidos: Academic Press.pag382.

Fox P, O'Connor T, Mcsweeney P, Guinee T, O' Brien. 1996. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. En: Taylor, S.L. eds. Advances in Food and Nutrition Research. v.39. Londres. Uk: Elsevier. pag 328.

ISO 1740/ IDF 006. 2004. Milkfat products and butter. Determination of fat acidity (Reference method). Brussels. 7 p.

ISO 5534/ IDF 004. 2004. Cheese and processed cheese. Determination of total solids content (Reference Method). Brussels. 7 p.

Juárez M, Fontecha J, Alonso L, Castillo I, Blasco, L. 2001. Normalización y mejora de queso semiduro, tradicional y con reducido contenido en grasa, de leche de cabra. Fundación Alfonso Escudero. Madrid, España. pp. 4-5.

Londoña Ospina M. 2009. Caracterización del Queso Momposino y Comparación con otros elaborados con adición o no de Cultivos Iniciadores. Tesis Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. pág 41.

Mcsweeney PLH. 2004. Biochemistry of Cheese Ripening. International Journal of Dairy Technology. 57:127-144.
Mcsweeney PLH, Sousa MJ. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Lait. 80: 293-324.
Meyer RM, Gaetano P, Usami OC, Medina FJ. 1992. Control de calidad de productos agropecuarios. 2ª ed. México D.F: Trillas, Manuales para educación. pag 102.
Molimard P, Spinnler HE. 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. Journal of Dairy Science 79: 169-184.
Muset G, Rodriguez MA. 2000. Contenido de ácidos grasos libres volátiles de ciertas variedades de quesos argentinos comerciales. Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Lechera (INTI-CITIL-PTM). Buenos Aires, Argentina. 56 p.
OMS/FAO. 2000. Leche y Productos Lácteos. Codex Alimentarius. V 12. 2° ed. pp. 23-74.
Pastorino AJ, Hansen CL, Mc Mahon DJ. 2003. Effect of pH on the Chemical Composition and Structure-function Relationship of Cheddar Cheese. Journal of Dairy Science. 86: 2751-2760.
Pinho O, Mendes E, Alves MM, Ferreira IMPLVO. 2004. Chemical, physical and sensorial characteristics of "Terrincho" ewe cheese: changes during ripening and intravarietal comparison. Journal of Dairy Science. 87: 249-257.
Ramonda MB. 2009. Desarrollo de un modelo basado en métodos estadísticos para la predicción del tiempo de maduración de Quesos Argentinos. Tesis de Doctorado en Química. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina. 30 p.
Reinheimer JA, Zalazar CA. 2004. Maduración de quesos y su control. En: Zalazar, C. A.; Candioti, M. C.; Bergamini, C. V.; Mercanti, D. J.; Meinardi, C. A. Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos. Santa Fe, Argentina: UNL. Pag 65.
Scott R. 1991. Fabricación de queso. Zaragoza, España: Acribia. Pag 450.
Soto Cartes AF. 2013. Determinación de Factores que Influyen en la Absorción de Sal en la Elaboración de Queso Gauda en Planta Procesadora de Alimentos Watt`s Alimentos. Tesis de grado de Ingeniero en Alimentos. Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp. 27-29.
Sousa, MF. 2015. Caracterización de la maduración de quesos provenientes de leche funcional y quesos gouda de elaboración regional mediante el seguimiento de la degradación proteolítica. Tesis de grado. 106 pp. UNMDP
Steinkraus H. 2002. Fermentations in world food processing. CRFSFS: Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 31:23-27.
Sukhija PS, Palmquist DL. 1988. Rapid method for determinations of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 36: 1202-1206.
Urbach G. 1993. Relations between cheese flavour and chemical composition. International Dairy Journal. 3: 389-422.
Vanden Berg G, Meijer E, Dusterhoft M, Smit G. 2004. Gouda and Related Cheese. En: Fox. P.F; Mcsweeney P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (eds.). Chemistry, Physics and Microbiology London.v.2. 3°ed. London, UK: Elsevier. pag 140.

Propiedades antioxidantes de hierbas compuestas para infusión: yerba mate, stevia y cedrón

Celaya L.S., González A.M., Tannuri M.C., Kolb E., Schüler G.M., Kolb-Koslobsky N.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Argentina.
lilianacelaya@hotmail.com; labcen@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue optimizar la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y los taninos totales en infusiones de hierbas compuestas por *Ilex paraguariensis* (yerba mate), *Aloysia citriodora* (cedrón) y *Stevia rebaudiana* (stevia). Utilizando un diseño experimental Simplex Centroide, se investigaron la infusiones preparadas con diferentes proporciones de hojas (p:p:p) de las tres especies. Las mezclas más activas frente a DPPH• y con mayor contenido de compuestos fenólicos se logran cuando yerba mate está en mayor proporción en la mezcla seguida por cedrón y stevia. Por otro lado, los más altos contenidos de taninos se obtienen en mezclas donde predominan cedrón+stevia y menores contenidos de taninos, en mezclas donde predominan cedrón+yerba mate.

Palabras clave: yerba mate, stevia, cedrón, mezcla, antioxidantes.

ABSTRACT

The aim of this study was to optimize the antiradical activity, the total phenolic content and the tannin content in composite formulation for infusion with "yerba mate" (*Ilex paraguariensis*), "cedrón" (*Aloysia citriodora*) and "stevia" (*Stevia rebaudiana*). A Simplex Centroid Design was used for the investigation of different mixtures (w:w:w) of leaves. On the basis of the results obtained, the preparations with higher phenolic compounds and best scavenging activity against DPPH• were obtained when yerba mate followed by cedrón predominated in the mixture. On the other hand, the highest tannin contents were achieved when cedrón+stevia predominated while the minimum tannin contents were achieved when yerba mate+cedrón predominated in the infusion.

Keywords: yerba mate, stevia, cedrón, mixture, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el consumo de las llamadas "hierbas compuestas", que consisten en mezclas de varias hierbas para infusión (CAA, 2013); cada especie aporta al sabor de la preparación diferenciando el producto y sumándose los fitoquímicos o los efectos benéficos de las hierbas que componen la mezcla (CAA, 2013; Scipioni *et al*., 2009). Muchas de las especies utilizadas en estas preparaciones son una interesante fuente de flavonoides, ácidos fenólicos y/o de taninos, entre otros fitoquímicos.

La infusión de consumo más extendido en Argentina y en otros países de la región es la que se obtiene de las hojas de *Ilex paraguariensis* o "yerba mate" (YM); en esta especie se han identificado y cuantificado con anterioridad, varios derivados del ácido hidroxicinámico (ácido clorogénico y sus derivados) además de flavonoides como rutina, quercetina y kaempferol (de Mejıa *et al*., 2010). A estos compuestos fenólicos se les atribuyen en parte, los efectos benéficos y también las propiedades antioxidantes de las infusiones de YM. Las hojas de *I. paraguariensis* pueden consumirse solas en la infusión o bien pueden agregarse hierbas sápido-aromáticas aprobadas por nuestra legislación (CAA, 2013), incluyendo menta, manzanilla, poleo o cedrón entre otras (Scipioni *et al*., 2009).

Particularmente el cedrón (CE) o *Aloysa citrodora* (syn. *Aloysa triphylla*), está entre las hierbas más consumidas en formulaciones compuestas con YM en nuestro país (Scipioni *et al*., 2009). Con anterioridad a este estudio, se identificaron y cuantificaron en infusiones de CE, diferentes flavonoides incluyendo

verbascosido y derivados glicosilados de luteolina y apigenina (Bilia *et al.*, 2008; Carnat *et al.*, 2012). Además del aroma característico aportado por compuestos volátiles como ser neral y el geranial, a las preparaciones con CE se le atribuyen propiedades digestivas y antiespasmódicas (Carnat *et al.*, 2012), debidas en parte a los compuestos fenólicos presentes en sus hojas.

Por otro lado, en los últimos años y desde la aprobación de *Stevia rebaudiana*, stevia (ST), para su utilización en formulaciones de hierbas compuestas (CAA, 2013); las hojas de ST se han comenzado a utilizar en formulaciones comerciales para proporcionar sabor dulce a las hierbas para infusión (CAA, 2013). Además de su capacidad endulzante, stevia se considera una planta medicinal por los efectos benéficos de su consumo en personas con patologías asociadas a la diabetes, la hipertensión o simplemente en regímenes especiales (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009; Khodjaeva *et al.*, 2013). Muchos estudios han profundizado en el conocimiento de la composición química de ST (Abou-Arab & Abu-Salem, 2010; De *et al*., 2013); los fitoquímicos de mayor importancia (obtenidos de ST), son los esteviol glicósidos aprobados actualmente por nuestra legislación para ser utilizados como edulcorantes (CAA, 2011); por otro lado, se le atribuyen a la ST, efectos antioxidantes debido a la presencia en sus hojas, de diversos flavonoides incluyendo derivados glicosilados de quercetina, de luteolina y apigenina, entre otros (Abou-Arab & Abu-Salem, 2010; Celaya *et al*., 2012; De *et al*., 2013).

Anteriormente, se determinó la actividad antioxidante de infusiones de hojas de ST de variedades cultivadas en nuestro país, estimándose también la proporción de hojas necesarias para endulzar una infusión; los EC_{50} frente a DPPH• estuvieron entre 17 – 30 µg/mL (Celaya *et al.*, 2012; González *et al*., 2015) mientras que la cantidad de hojas necesaria para aportar sabor dulce fue de 0,2 – 0,4 g por taza (Celaya *et al*., 2012). También se determinaron previamente, las proporciones óptimas de yerba mate, té verde y stevia para obtener infusiones de hierbas compuestas por con mayor actividad antioxidante (González *et al*., 2015).

El objetivo del presente trabajo fue optimizar hierbas compuestas por YM, ST y CE a fin de definir las proporciones óptimas de cada componente en la mezcla, para producir infusiones con mayor contenido de compuestos fenólicos antioxidantes y con sabor dulce.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado fueron hojas secas de CE obtenidas en la feria local y YM de una marca comercial "RS". La ST utilizada fue de una variedad mejorada (Celaya *et al*., 2012), cultivada actualmente de manera experimental en la provincia de Misiones (cosecha de enero).

Las hojas de CE y de ST se molieron y se tamizaron utilizando un tamiz de malla de 20 mesh. En el caso de YM comercial, se separaron los palos y se repitió el mismo procedimiento.

El contenido de esteviol glicósidos en las hojas de ST, cuantificado por HPLC (según Kolb *et al*., 2001), fue comparable al reportado con anterioridad a este trabajo en muestras de la misma variedad (Celaya *et al*., 2012): Esteviósido =3,6%, Rebaudiósido A 10,6%, Rebaudiósido C= 0,4%, por lo cual puede asumirse que el poder edulcorante en las infusiones es comparable al determinado con anterioridad.

Infusiones

Las infusión se obtuvieron según Celaya *et al*. (2012); 2 g de mezcla de prueba se extrajeron con agua bi-destilada a temperatura de ebullición durante 5 min; se filtraron y se mantuvieron en heladera hasta su procesamiento analítico. Para fines de comparación, se prepararon también infusiones de té negro comercial "A" (en sobres), obtenido en un comercio local; estas muestras fueron desprovistas de sus sobres para su procesamiento.

Las concentraciones de sólidos totales o extractos secos de las infusiones (ES), se determinaron por secado a 102±2°C hasta peso constante y las concentraciones de extractos se ajustaron a 3 mg/mL para todas las mezclas de prueba. Los extractos obtenidos en cada condición (n=3) se reunieron a fin de tener muestras homogéneas para las determinaciones analíticas *in vitro*.

Capacidad de capturadora de DPPH•

Las infusiones se utilizaron para preparar diluciones seriadas de ES entre 47-3000 µg/mL; la actividad

antioxidante se evaluó utilizando solución metanólica de las diluciones de extracto y concentraciones convenientes de solución del antioxidante sintético BHT (2-terbutil-hidroxitolueno) como referencia.
Se evaluó el porcentaje de inhibición (% I) por la disminución de absorbancia del DPPH• a 515 nm en la mezcla de 1000 µL del DPPH• (1,1-difenil picrilhidracilo) y 125 µL de extracto, a los 30 min de reacción en la oscuridad (Celaya *et al*., 2016). Se determinó la capacidad capturadora de radicales libres expresada como EC_{50} (concentración de extracto necesaria para reducir la concentración de los radicales libres a la mitad).
A fin de indagar la presencia de sinergismo, adición o antagonismo en la actividad antiradicalaria por efecto de la mezcla de componentes, se determinó *FIC* (concentración inhibitoria fraccional), dada por la siguiente ecuación (Romano *et al*., 2009):

$$FIC = FIC_{YM} + FIC_{CE} + FIC_{ST} \quad (1)$$

Donde *FIC* es la suma de los aportes de los componentes FIC_{YM}, FIC_{CE} y FIC_{ST} a la actividad antiradicalaria de la mezcla (Romano *et al*., 2009):

$$FIC_{YM} = \frac{EC_{50,YM\ en\ la\ mezcla}}{EC_{50,YM\ sola}} \quad (2)$$

$$FIC_{CE} = \frac{EC_{50,CE\ en\ la\ mezcla}}{EC_{50,CE\ solo}} \quad (3)$$

$$FIC_{ST} = \frac{EC_{50,ST\ en\ la\ mezcla}}{EC_{50,ST\ sola}} \quad (4)$$

Las *FICs* determinados representan una ponderación de este índice, ya que en su cálculo no se considera la posible extracción diferencial de sólidos a partir de cada matriz vegetal en las mezclas para infusión.

Fenoles totales

El contenido de compuestos fenólicos (FT) se determinó por Folin Ciocalteu utilizando la técnica descripta por Bubonja-Sonje *et al.* (2011), con ligeras modificaciones. Se pusieron en contacto 50 µL de extracto y 50 µL de solución de Folin Ciocalteu, se incubo por 2 min, se adiciono 50 µL de carbonato de sodio al 7,5% y se completó con agua bi-destilada a un volumen final de 2 mL. Cada mezcla de ensayo se incubó durante 60 min en la oscuridad, luego se midió la absorbancia a 750 nm. Para la cuantificación se utilizó una regresión lineal, ajustando los datos de absorbancia medidas en soluciones de ácido gálico que se ensayó entre los 500-99 µg/mL (concentraciones iniciales). Los resultados se expresaron como mg AGE/g s.s. (mg de ácido gálico equivalente por g de extracto seco).

Taninos totales

El contenido de taninos totales (TT) se determinó utilizando solución de poli (vinil polipirrolidona) PVPP, (Azrul *et al*., 2014). A 1 mL de la preparación anterior se adicionó 500 µL de solución PVPP al 10%. Las muestras se agitaron con ayuda de vortex, se incubaron por 15 min a 5ºC en la oscuridad, se centrifugaron por 10 min y finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante a 750 nm; los TT se determinaron por diferencia.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental Simplex Centroide, mezclando hojas secas molidas de stevia, yerba mate y cedrón en diferentes proporciones p:p:p (Tabla 1) para alcanzar un peso final de 2 g. Se evaluó el efecto de la mezcla sobre extracción de sólidos, la actividad antiradicalaria y el contenido de compuestos fenólicos y de taninos en las infusiones obtenidas. Los ensayos se realizaron por triplicado. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI. Las diferencias medidas se consideraron significativas cuando *p*-valor < 0,05 (NC=95%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimientos de extracción de las infusiones

Los ES medidos en las infusiones, se presentan en la **Tabla 1** (**Figura 1**). La variabilidad explicada proporcionada por la el modelo Cuadrático, R^2 fue mayor al 90% (**Tabla 1**). Se obtienen resultados comparables cuando se realiza la infusión partiendo de YM sola o CE solo (3,4 y 3,5 mg/mL respectivamente). Si la infusión se realiza partiendo de ST sola, se extraen en general más sólidos totales, ES=5,0 mg/mL.

Los resultados obtenidos indican que la extracción de sólidos en la infusión, aumenta a medida que aumenta la proporción de ST en la mezcla (**Figura 1** y **Tabla 1**); este comportamiento puede atribuirse al aumento de la extracción de esteviol glicósidos con los otros fitoquímicos de la matriz vegetal, a medida que aumenta la proporción de ST en la hierba compuesta.

Actividad antioxidante

Los EC_{50} determinados se listan en la **Tabla 1**. La representación gráfica de la variación de la actividad antioxidante con la composición de la mezcla para infusión se presenta en la **Figura 2**. En cuanto a la capacidad capturadora de DPPH•, los EC_{50} variaron entre 11,1 y 40,3 µg/mL; el EC_{50} del BHT utilizado como control fue de 26,9 µg/mL (**Tabla 1**). La variabilidad explicada en el comportamiento observado y proporcionada por la el modelo cuadrático elegido, fue mayor al 98%.

Al analizar los resultados del experimento, se definió que las mezclas más activas (con menor EC_{50}), se obtienen cuando YM está en mayor proporción en relación a CE y ST (EC_{50} <15 µg/mL) (**Figura 2.b**); por otro lado las infusiones menos activas son las que se obtienen cuando el CE está en mayor proporción con respecto a las otras hierbas en la mezcla.

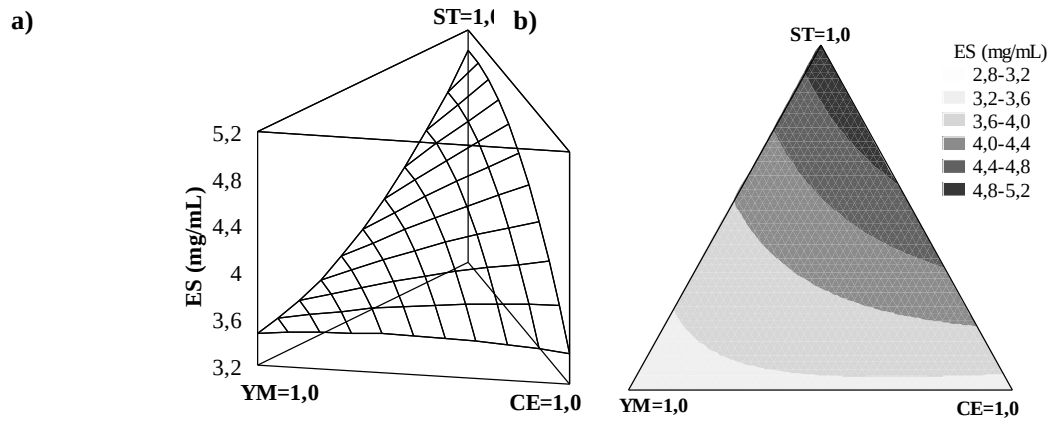


Figura 1. Representación de ES (mg/mL) en función de la composición de la mezcla para infusión (p:p:p), en superficie de respuesta (a) y curvas de nivel (b)

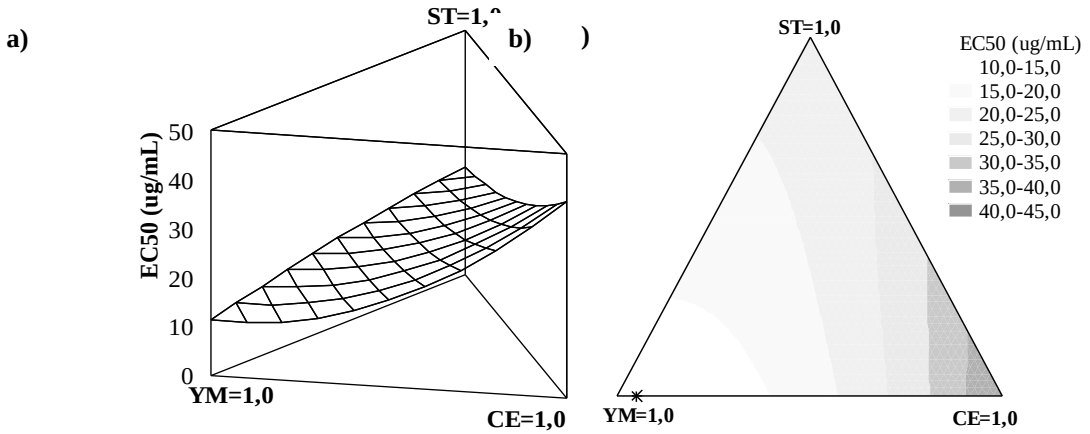


Figura 2. Representación de EC_{50} (µg/mL) en función de la composición de la mezcla para infusión (p:p:p), en superficie de respuesta (a) y curvas de nivel (b)

Contenido de compuestos fenólicos

Los resultados obtenidos en el orden del diseño se listan en la **Tabla 1**. La representación gráfica de la variación del contenido de compuestos fenólicos en las infusiones (FT), se presenta en la **Figura 2**.

Los FT variaron entre 46,8 y 115,4 mg AGE/g s.s. entre CD y YM, respectivamente. Las infusiones con mayor contenido de FT, se obtienen cuando YM está en mayor proporción con respecto a ST y CR (**Figura 3.a** y **3.b**, **Tabla 1**); las infusiones con menor contenido de FT se obtienen cuando CD está en mayor proporción con respecto a los otros componentes (**Figura 2.B**); entre 40,0 y 50,0 mg AGE/g s.s.

Los resultados medidos en té negro comercial utilizado como control también se presentan en la **Tabla 1**.

Contenido de taninos totales

Los TT cuantificados (**Tabla 1**; **Figura 3.c** y **3.d**) son los compuestos fenólicos que precipitaron con solución de PVPP, en frio y en la oscuridad a partir de la solución utilizada para determinar FT (Azrul *et al*., 2014). Este valor se obtuvo por diferencia de absorbancia luego de aplicar el mencionado tratamiento a cada mue

Las infusiones con mayor contenido de taninos (TT > 40,0 mg AGE/g s.s) se obtienen cuando ST y CE están en proporciones comparables y YM está en baja concentración en la mezcla (**Figura 3.c** y **3.d**).

De los casos considerados, el menor contenido de taninos se cuantificó en mezclas de iguales proporciones de los tres componentes (**Tabla 1**). Por otro lado, en la **Figura 3.d**, se representa la zona de composiciones de mezclas con menor contenido de TT, siendo estas las que se obtienen con similares proporciones de YM y CE y con bajo contenido de ST (TT<10,0 mg AGE/g s.s).

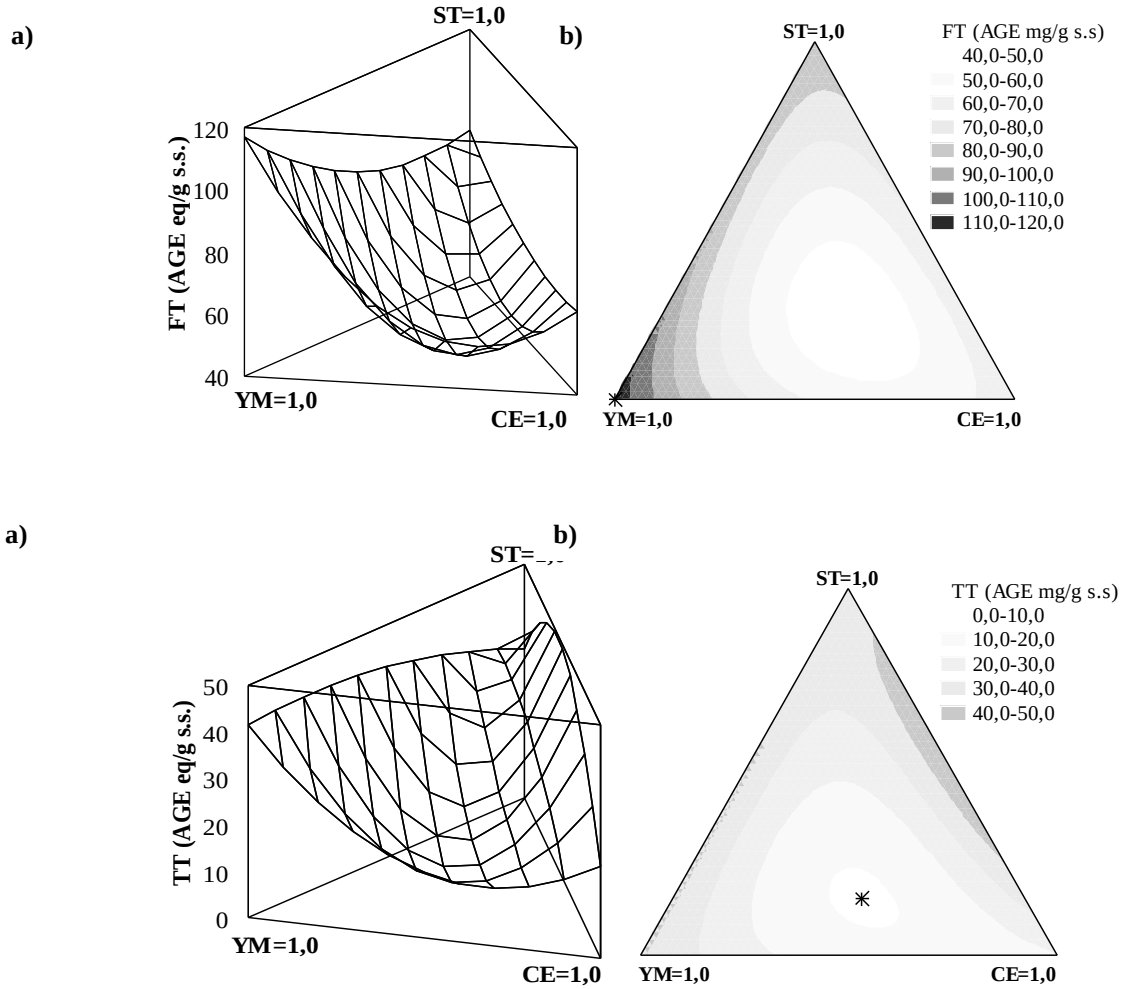


Figura 3. Representación de la variación de FT en función de la composición de la mezcla para infusión (a) en superficie de respuesta y (b) en curvas de nivel; representación de la variación de TT en función de la composición de la mezcla para infusión (c) en superficie de respuesta y (d) en curvas de nivel.

Presencia de sinergismo, adición o antagonismo

Las *FIC* (aparentes) estimadas para las mezclas de prueba, se presentan en la **Tabla 1**; se obtuvieron valores entre 1,0 – 1,2 indicando en las mezclas consideradas, la adición de efectos en la actividad antiradicalaria frente a DPPH• (Romano *et al*., 2009); esto a excepción de la mezcla YM:CE (1:1) donde *FIC* = 0,5, por lo cual, cuando se preparan infusiones partiendo de similares proporciones de YM y CE el efecto en la actividad antioxidante sería sinergismo.

Tabla 1. Valores de variables respuesta en el orden del diseño experimental

Ensayo	Componente			Variables respuesta (*)				
	X_1	X_2	X_3	ES (mg/mL)	EC_{50} (µg/mL)	FT (mg AGE / g s.s)	TT (mg AGE / g s.s)	*FIC*
1	1,0	0,0	0,0	3,4 ± 0,2 [a]	11,1 ± 0,3 [a]	117,3 ± 2,0 [a]	41,4 ± 1,0 [c]	-
2	0,0	1,0	0,0	3,5 ± 0,3 [a]	40,2 ± 0,6 [e]	66,9 ± 0,6 [c]	19,5 ± 0,2 [a]	-
3	0,0	0,0	1,0	5,0 ± 0,3 [d]	22,0 ± 1,7 [c]	87,3 ± 4,9 [b]	31,9 ± 5,5 [b]	-
4	0,5	0,5	0,0	3,5 ± 0,1 [a]	18,1 ± 0,6 [b]	58,5 ± 2,1 [d]	14,1 ± 1,6 [a]	0,5
5	0,5	0,0	0,5	3,9 ± 0,2 [b]	18,2 ± 0,8 [b]	89,8 ± 3,7 [b]	41,0 ± 0,8 [c]	1,2
6	0,0	0,5	0,5	4,6 ± 0,1 [c]	28,1 ± 1,0 [d]	69,9 ± 2,2 [c]	49,0 ± 0,6 [d]	1,0
7	0,33	0,33	0,33	4,1 ± 0,1 [b]	18,9 ± 1,1 [b]	46,8 ± 2,7 [e]	13,2 ± 1,9 [a]	1,0
BHT control				-	25,9 ± 0,4	-	-	-
Té negro comercial (control)				-	11,2 ± 0,4	110,6 ± 1,7	68,6 ± 3,9	-
Modelo				Cuadrático	Cuadrático	Cúbico Especial	Cúbico Especial	-
R^2 (%)				93,2	98,9	98,8	98,0	-
R^2_{GL} (%)				91,0	98,6	97,2	97,2	-
p-valor				$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	-
GL				20	20	20	20	-

X_1, fracción de hojas de YM en la mezcla; X_2, fracción de hojas de CE en la mezcla; X_3, fracción de hojas de ST en la mezcla; (*) valor medio ± desviación estándar (n=3); a, b, c, d, e son grupos homogéneos de valores de variable respuesta (determinados por ANOVA y prueba de Tukey HSD); R^2, porcentaje de variabilidad explicada

Formulaciones optimizadas

La optimización realizada al analizar los datos obtenidos permitió ponderar las proporciones adecuadas de cada componente (g de hojas por cada 2 g de hierba compuesta) en infusiones donde se busque optimizar el contenido de sólidos totales en las infusiones (maximizar ES), la actividad antiradicalaria (minimizar EC_{50}), la extracción de compuestos fenólicos (maximizar FT) o bien el contenido de taninos totales (maximizar o minimizar TT, según el caso). Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2**.

Por otro lado, en las **Figuras 1**, **2** y **3** quedan bien representadas las zonas de composiciones de mezclas apropiadas para obtener infusiones con mayor contenido de compuestos fenólicos antioxidantes o con mayor o menor contenido de taninos o de sólidos totales.

Tabla 2. Peso de hojas de cada componente (g) por cada 2 g de hierba compuesta optimizada

Componente	Formulación optimizada según el objetivo buscado				
	Maximizar ES	Minimizar EC_{50}	Maximizar FT	Maximizar TT	Minimizar TT
YM	0,02	1,88	1,96	0,02	0,78
CD	0,08	0,10	0,02	0,86	0,92
ST	1,92	0,02	0,02	1,12	0,30

Al respecto, es necesario recordar que solo son necesarios 0,2 – 0,4 g de hojas de ST si el efecto buscado es endulzar la infusión (Celaya *et al*., 2012). Podrán obtenerse mezclas más activas variando las proporciones de YM y CD con baja proporción de ST, manteniéndose en la zona óptima si el propósito es lograr mayor actividad antioxidante y sabor dulce (**Figura 2.a** y **2.b**). En un estudio anterior, se obtuvieron resultados similares la investigar el efecto de la mezcla sobre la actividad antioxidante de hierbas compuestas por té verde, yerba mate y stevia (González *et al*., 2015).

En cuanto al contenido de taninos, podrán obtenerse hierbas compuestas más ricas en estos fitoquímicos,

utilizando proporciones comparables de CE y ST en la mezcla (**Figura 3.c** y **3.d**). Si el objetivo buscado son infusiones con menor contenido de taninos, pueden plantearse en cambio, mezclas con YM y CE en comparables proporciones; en este caso solo se requiere el agregado de ST en cantidad suficiente para endulzar la infusión.

Cabe destacar que las hierbas compuestas que se formulen deben ser optimizadas por evaluación sensorial, a fin de definir por porcentajes adecuados de cada componente que proporcionen mejor sabor. No se conoce el efecto de la composición (compuestos fenólicos antioxidantes, edulcorantes o taninos) sobre la aceptabilidad sensorial de las mezclas optimizadas en este trabajo.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos puede concluirse que las hierbas compuestas con mayor potencial como fuentes de antioxidantes se obtienen cuando la proporción de YM es superior a las otras hierbas o bien con similares proporciones de YM y CE y bajo contenido de ST.

Por otro lado, los más altos contenidos de taninos se obtienen en formulaciones con similares proporciones de CE y ST y menores contenidos de taninos se logran en mezclas con similares proporciones CE y YM; el agregado de ST puede hacerse entonces, en cantidad suficiente para endulzar la infusión sin que esto modifique notablemente las propiedades antioxidantes de las mezclas formuladas.

Finalmente, las mezclas que se formulen deben ser optimizadas sensorialmente, en miras a obtener alimentos con dulzor y sabor atractivos para los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

Abou-Arab EA & Abu-Salem FM. 2010. Evaluation of bioactive compounds of Stevia *rebaudiana* leaves and callus. African Journal of Food Science, 4(10):627-634.

Azrul LM, Nurulaini R, Adzemi MA, Marina H, Effendy AWM. 2014. Tannins quantification in *Terminalia catappa* leaves extract and antihelmenthic potential evaluation. Journal of Natural Products 5(7):98-103.

Bilia AR, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri FF. 2008. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46:463-470.

Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. Food Chemistry 127:1821-1827.

CAA. 2013. Código Alimentario Argentino, Cap. XV, Productos Estimulantes o Fruitivos. Artículo 1192 a 1198triss. - [Actualización 02/2013]. Disponible en www.anmat.gov.ar

CAA. 2014. Código Alimentario Argentino, Cap. XVIII, Aditivos Alimentarios. Artículo 1192 tris [Actualización 01/2014]. Disponible en www.anmat.gov

Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Lamaison JL. 1999. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. Fitoterapia 70:44-49.

Celaya LS, Viturro CI, Silva LR, Moreno S. 2016. Natural antioxidants isolated from *Schinus areira* leaves by ultrasound-assisted extraction. International Journal of Food Studies 5: 167-179.

Celaya LS, Cabana R, Viturro CI, Molina A, Kolb KN. 2012. Infusión de *Stevia rebaudiana* Bertoni: sólidos totales, esteviolglicósidos endulzantes y actividad antioxidante. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina; Análisis físicos, químicos y sensoriales pp.92-97.

Chatsudthipong V & Muanprasat C. 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. Pharmacology & Therapeutics, 121:41-54.

de Mejıa EG, Song YS Hec CI, Ramırez-Mares MV. 2010. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. Journal of Functional Foods 2:23-34.

De S, Mondal S, Banerjee S. 2013. Stevioside: Technology, Applications and Health, Ed. John Wiley & Sons, Ltd. Cap 1: Introduction to Stevioside, pp. 1-23.

González AM, Kolb E, Schuler GM, Kolb N, Celaya L. 2015. Hierbas compuestas para infusión con propiedades antioxidantes y stevia. VII Jornadas Científico Tecnológicas Libro de Resúmenes, ISBN 978-950-766-112-9. Trabajo completo, pp. 354-357.

Khodjaeva U, Bojňanská T, Vietoris V, Sytar O, Singh R. 2013. Food Additives as Important Part of Functional Food. International Research Journal of Biological Sciences 2(4):1-6.

Kolb N, Herrera JL, Ferreyra DJ y Uliana RF. 2001. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana:* Improved HPLC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 49:4538-4541.

Romano CS, Abadi K., Repetto V, Vojnov AA, Moreno S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chemistry 115 456-461.

Scipioni GP, Ortiz DE, Seidel Jacobsen AL, Argüello B-V 2009. Determinación de umbrales de identificación de hierbas adicionadas a la yerba mate compuesta. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina. Análisis físicos, químicos y sensoriales pp. 333-338.

Calidad de cubos de papa procesados con diferentes tecnologías

Ceroli P.[(1)], García Procaccini L.[(2)], Lagos Hernández G.[(1)], Corbino G.[(3)]

(1) INTA, Ruta 226, Balcarce, Buenos Aires, Argentina
(2) CONICET, Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP, Argentina
(3) INTA, San Pedro, Buenos aires, Argentina
ceroli.paola@inta.gob.ar

RESUMEN

Cubos de papa, variedad Innovator fueron sometidos a diferentes tratamientos: deshidratación osmótica (DO), recubrimiento comestible (RC), recubrimiento comestible con deshidratación osmótica (RC+DO), inmersión en antioxidantes (A) y escaldado en microondas (E). La calidad de los productos obtenidos se evaluó mediante la determinación de la luminosidad, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante. Los cubos de papa sometidos a hervor fueron evaluados mediante un panel entrenado compuesto por ocho jueces, utilizando la metodología de análisis descriptivo cuantitativo (QDA). Los atributos analizados fueron: apariencia global, color, olor, sabor, dureza y humedad.

La luminosidad no difirió entre los distintos tratamientos, el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante de los cubos de papa tratados con DO, RC + DO fue mayor que en las muestras de control. Los cubos de papa hervidos, previamente conservados mediante tecnología de A y E presentaron una mejor apariencia global. Los cubos de papas tratados con DO, RC + DO y A tienen una mejor calidad nutricional que las muestras tratadas con E, RC y la muestra control.

Palabras claves: evaluación sensorial, fenoles totales, capacidad antioxidante, cubos de papa procesados.

ABSTRACT

Potato cubes, Innovator variety, were subjected to different treatments: osmotic dehydration (OD), edible coating (EC), edible coating with osmotic dehydration (EC + OD), immersion in antioxidants (A) and microwave blanching (E). The quality of the products obtained was evaluated by the determination of the luminosity, the content of total phenols and the antioxidant capacity. The boiled potato cubes were analyzed by a trained panel composed of eight judges, using the methodology of quantitative descriptive analysis (QDA). The attributes analyzed were: overall appearance, color, odour, taste, hardness and humidity.

The luminosity did not differ between the different treatments, the phenol content and the antioxidant capacity of potato cubes treated with DO, RC + DO was higher than in the control samples. Boiled potatoes, previously preserved using A and E technologies, presented a better overall appearance. Potato cubes treated with DO, RC + DO and A have a better nutritional quality than the samples treated with E, RC and the control sample.

Keywords: sensory evaluation, total phenols, antioxidant capacity, processed potato cubes.

INTRODUCCIÓN

La papa, *Solanum tuberosum* L., constituye uno de los principales alimentos en la canasta familiar, siendo uno de los vegetales más frecuentes en la elaboración de las comidas diarias, razón por la cual presenta una demanda en aumento por parte de los gastronómicos, instituciones y cocinas domésticas. Entre los procesamientos no tradicionales de la papa se ha generalizado el procesado mínimo del tubérculo, basado en el pelado y cortado, como bastones, cubos, entre otros. Sin embargo, la mayor dificultad en la elaboración de papa procesada consiste en su corta vida útil debido a las alteraciones microbiológicas y químicas. En el tejido cortado se origina, en presencia de oxígeno, un pardeamiento enzimático causado al ponerse en

contacto la polifenoloxidasa (PPO) con los sustratos fenólicos contenidos en las vacuolas celulares, las cuales se rompen durante este proceso. La formación de los pigmentos oscuros durante el procesado y almacenamiento es un fenómeno muy común que no solo involucra el color y el aspecto de la papa, sino también su sabor y valor nutritivo. Esto es uno de los mayores problemas asociados al procesamiento y almacenamiento de estos productos. El pardeamiento puede ser controlado mediante la inactivación por calor (escaldado), inhibición enzimática, exclusión, remoción o transformación de los sustratos (oxígeno y fenoles), disminución del pH por debajo del rango óptimo de actividad (Jiang et al., 1999; Langdon, 1987; Pizzocaro et al., 1993) y adición de antioxidantes que inhiban la acción de la polifenoloxidasa (PPO).

La ventaja de los vegetales procesados (VP) se basa en que son productos listos para su consumo o de rápida preparación, de alta calidad nutritiva y organoléptica siendo una opción de agregado de valor para los productos frutihortícolas regionales. Es necesario mantener el producto a temperatura de refrigeración en todas las etapas del proceso, almacenamiento, comercialización y distribución, la cual debe ser continua y actuar sinérgicamente con otros métodos de conservación. La reducción leve de la actividad acuosa (aw) es uno de los factores de conservación que permite obtener un producto de alta humedad o de humedad intermedia con una buena calidad organoléptica (Reppa et al. 1999, Barat et al. 2001). El proceso de deshidratación osmótica (DO) permite impregnar no sólo el soluto usado para controlar la aw sino también los agentes antimicrobianos y antipardeamiento deseados o cualquier otro soluto para mejorar la calidad nutricional, funcional, sensorial y microbiológica.

Algunos recubrimientos comestibles se aplican para extender la vida útil de frutas y vegetales mínimamente procesados, ya que reducen la pérdida de humedad y de solutos, la velocidad de la respiración y de las reacciones oxidativas; retardan cambios en la textura, mejoran la integridad mecánica, controlan el intercambio de gases y facilitan la manipulación.

También se utilizan tratamientos con agentes antioxidantes naturales para prevenir el pardeamiento enzimático, como el ácido ascórbico (AA) y el ácido cítrico (AC), utilizados en forma individual o combinados para aumentar la eficacia (Laurila et al. 1998, Limbo y Piergiovanni 2006, Rocculi et al. 2007), evitando así el uso de los sulfitos tan cuestionados por la FDA (1994). El ácido cítrico ejerce un efecto inhibidor sobre la PPO mediante dos mecanismos: por quelación del cobre (necesario para el funcionamiento de la enzima) y por acidulación, disminuyendo el pH y por lo tanto la actividad de la misma (Jiang et al. 1999). El ácido ascórbico previene el pardeamiento enzimático por reducción de compuestos quinonicos a sus compuestos polifenolicos originales (Walter 1977).

El escaldado de vegetales puede ser realizado exponiendo los mismos a agua caliente (método más común), a soluciones calientes o en ebullición conteniendo ácidos y/o sales, con vapor de agua (Kidnose y Martens 1999) o bien irradiando con microondas los productos inmersos en agua o soluciones por varios minutos o segundos (Severini et al. 2001).

Los atributos que definen la calidad sensorial son diferentes para cada tipo de producto (papa hervida, frita en bastones, rodajas, etc.). Son variadas las opiniones sobre el valor de los atributos. Ulrich et al. (2000) y Luning et al. (1994) aseguran que el sabor de la papa es un criterio esencial de calidad en los mercados saturados de oferta, donde el consumidor ha llegado a ser muy crítico. Otros autores, como Thybo y Martens (1999), y van Dijk et al. (2002), destacan a la textura como un atributo de calidad importante en muchos alimentos y como un factor esencial en la aceptabilidad de las papas por el consumidor. Blahovec et al. (2000) mencionan que las propiedades de textura dependen del tiempo de cocción. Otros autores aseguran que la diversidad en la textura de la papa cocida y sus productos está en gran medida determinada por la variedad, con los efectos agronómicos que implica, y que esto ha originado demandas de variedades específicas tanto para la industria procesadora de alimentos como para el consumo fresco (Thybo y Martens 2000; van Dijk et al. 2002).

La evaluación sensorial de un producto, realizada con jurados analíticos es ampliamente usada en la industria alimentaria. La descripción de las propiedades sensoriales de una muestra para considerar la intensidad de cada una se realiza a través de los perfiles sensoriales descriptivos (PSD). Los PSD se pueden aplicar a alguno de los atributos usando técnicas específicas como la del "perfil del sabor" (Gómez et al. 1998, Hoberg et al. 1998); "perfil del olor" (Martin et al. 2000, Ulrich et al. 2000); "perfil de textura" (Thybo y Martens

1999 y 2000, Blahovec et al. 2000, van Dijk et al. 2002) o se pueden aplicar a la totalidad de los atributos de un producto (Chabanet 2000, Montouto Graña et al. 2000). En este caso, uno de los métodos más usados es el análisis descriptivo cuantitativo (QDA) (Stone et al. 1974).
El desarrollo de perfiles sensoriales descriptivos puede realizarse por técnicas univariadas, estableciendo las diferencias entre las muestras respecto de cada atributo, o por técnicas multivariadas, evaluando en forma global la influencia relativa de cada uno (Pastor et al. 1996).
El objetivo de este trabajo fue caracterizar sensorialmente y evaluar diferentes parámetros de interés nutricional de cubos de papas, variedad Innovator sometidos a: a) deshidratación osmótica (DO), b) recubrimiento comestible más deshidratación osmótica (DO + RC), c) recubrimiento comestible (RC), d) escaldado en microondas (E) y e) aplicación de antioxidantes (A).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron papas de la variedad Innovador, cosechadas en Febrero 2016 en el sudeste Bonaerense. Las papas se pelaron y lavaron con agua destilada a 4°C (Angós et al. 2008). Las muestras se cortaron en cubos de 1x1 cm, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente antes de ser sometidos a los distintos tratamientos de conservación.

Tratamientos

Control (C)

Es la papa cruda en el momento en que fueron aplicados el resto de los tratamientos.

Deshidratación osmótica (DO)

Los cubos de papa fueron deshidratados osmóticamente en solución de sorbitol (SO) (40%), con agregado de cloruro de sodio (5%) y de agentes antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico, 0.5%). Se trabajó a 40°C y el tiempo de inmersión fue de 2 horas.

Recubrimiento comestible (RC)

Cubos de papas frescas se lavaron en agua destilada y se sumergieron en alginato de sodio al 1% durante 5 minutos. A continuación, los cubos se retiraron de la solución de recubrimiento y se sumergieron en cloruro de calcio al 1% (CaCl2) durante 30 minutos.

Recubrimiento comestible con deshidratación osmótica (RC + DO)

Los cubos de papas recubiertos con el mismo tratamiento de RC, fueron deshidratados osmóticamente en las mismas condiciones que se ha explicado anteriormente (DO + A).

Inmersión en solución de antioxidantes (A)

Los cubos de papa fueron inmersos en un solución de AA 1% + AC 1%, durante 5 minutos. Las concentraciones de los agentes antioxidantes se seleccionaron de ensayos anteriores (García Procaccini et al. 2014).

Escaldado Microondas (E)

Los cubos de papa se sumergieron en una solución de NaCl al 2% y $CaCl_2$ al 0,2%. El proceso de escaldado se realizó en un microondas doméstico durante 10 minutos con una potencia de 560W.

Parámetros de calidad de los cubos de papa sometidos a los diferentes tratamientos previo a su cocción

Determinación de color

Se midió el color de los cubos con un Colorímetro MINOLTA (Chromameter CR300). El parámetro utilizado fue la luminosidad (L*).

Determinación de fenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteau, se expresó como µg equivalentes de ácido gálico/g.p.f (AGE) (Blessington 2005).

Determinación de la capacidad antioxidante

Se midió con DPPH (1.1 difenil-2picrilhidrazil), (Brand-Williams et al. 1995). Los resultados fueron expresados en µg equivalentes de Trolox/g.p.f.

Análisis y Diseño experimental

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y comparación de medias de

Tukey al 5% de probabilidad, mediante el programa Infostat, 2016. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado.

Análisis Sensorial

A las 24 hs que se realizaron los tratamientos con las diferentes tecnologías, se realizó la cocción mediante hervor en agua por 20 minutos. Una muestra control hervida (sin tratamiento) fue presentada junto con las demás muestras tratadas el día del ensayo.

Se trabajó con un jurado de ocho miembros pertenecientes al INTA y a la FCA, seleccionado y entrenado en análisis descriptivo cuantitativo (IRAM 20005-1), con experiencia previa en evaluación sensorial de papa. Los descriptores utilizados fueron apariencia global, color, olor, sabor y textura (dureza y humedad); se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm de longitud, ancladas en los extremos con términos descriptivos.

Las muestras correspondientes a cada tratamiento fueron colocadas en cápsulas de Petri codificadas con números de tres dígitos elegidos al azar y colocadas sobre una bandeja con fondo blanco. Las muestras fueron presentadas a los evaluadores en forma simultánea.

Para la evaluación de las muestras se realizó un diseño en bloques completos balanceado. Cada bloque completo se formó con un evaluador y la repetición. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico Infostat (2016). El primer paso fue un análisis de varianza para determinar si existía efecto de los tratamientos y en caso afirmativo las comparaciones entre los tratamientos se realizaron a través del método de Tukey-Kramer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de L* no mostraron diferencias significativas entre las diferentes tecnologías de conservación (**Figura 1**).

El contenido de fenoles totales (FT) de cubos de papas conservados con diferentes tecnologías fue mayor en las muestras tratadas con DO, RC + DO (**Figura 2**). Las muestras tratadas con E, RC no se diferenciaron del control, presentando un bajo contenido de FT. Estos resultados se correlacionaron con la capacidad antioxidante, que presentó un comportamiento similar entre las diferentes tecnologías (**Figura 3**).

La adición de AA en este tipo de tratamiento podría ser una manera de enriquecer el tejido vegetal, y también de contribuir a un aumento en la actividad antioxidante que normalmente deriva de compuestos bioactivos endógenos (García Procaccini 2013).

Las muestras tratadas con A y E presentaron una apariencia global mayor que el resto de los tratamientos y similares al control. Las muestras A y E presentaron un color amarillo claro característico de la variedad, no mostrando diferencias con el control C mientras que las muestras DO, DO + RC presentaron una tonalidad marrón claro. La intensidad de olor y sabor fue característico a papa hervida en las muestras tratadas con A, E y RC mientras que en los cubos DO y DO + RC presentaron otro olor y sabor debido al tratamiento de deshidratación osmótica utilizado. Las muestras con DO y DO + RC presentaron una mayor dureza y menor humedad comparadas con el resto de los tratamientos (**Figura 4**).

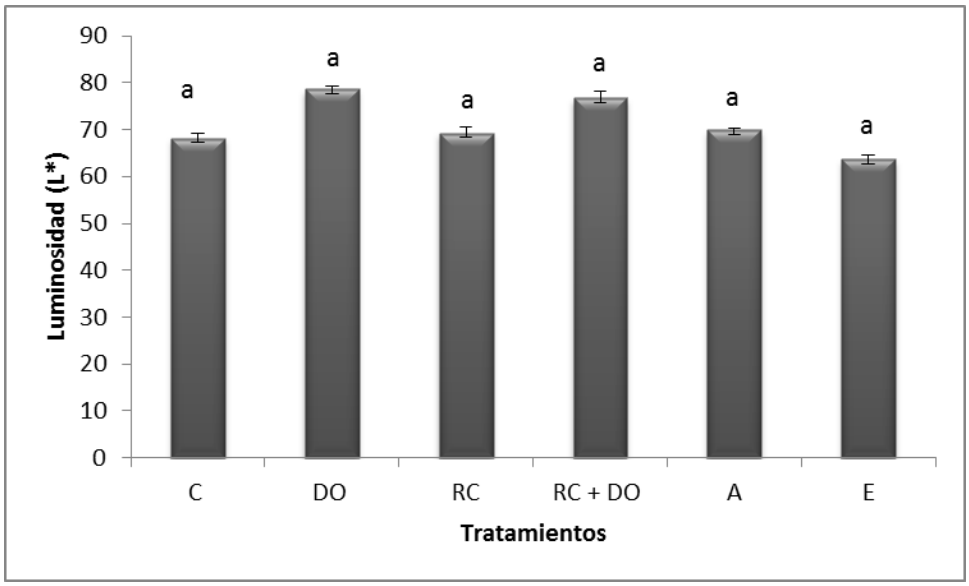


Figura 1. Luminosidad de cubos de papa tratados con DO, RC, RC+DO, A, E y Control (C). Medias ± DE. Las mismas letras en las columnas indican que no diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$).

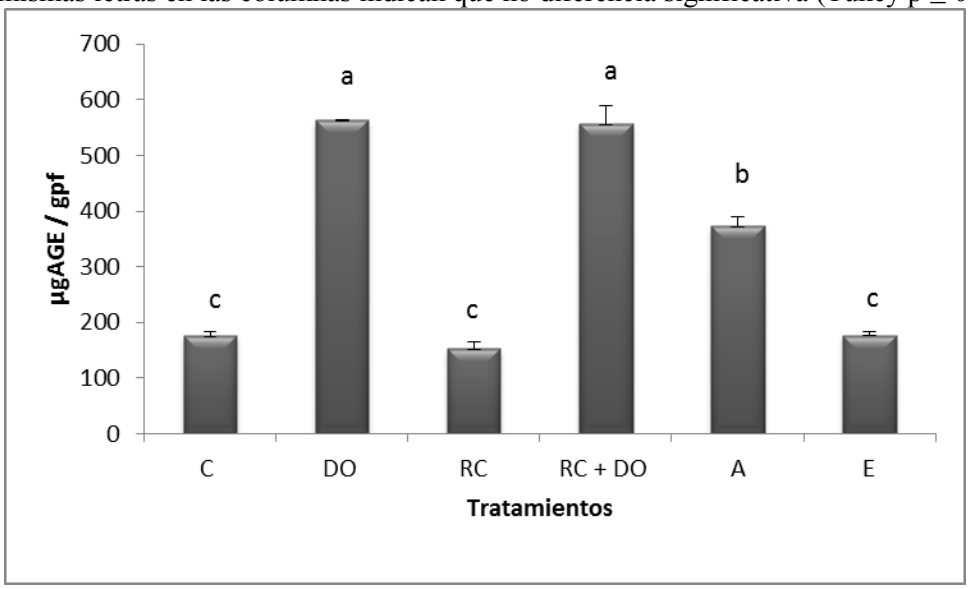


Figura 2. Contenido de fenoles totales de cubos de papa tratados con DO, RC, RC+DO, A, E y Control (C). Medias ± DE. Las mismas letras en las columnas indican que no diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$).

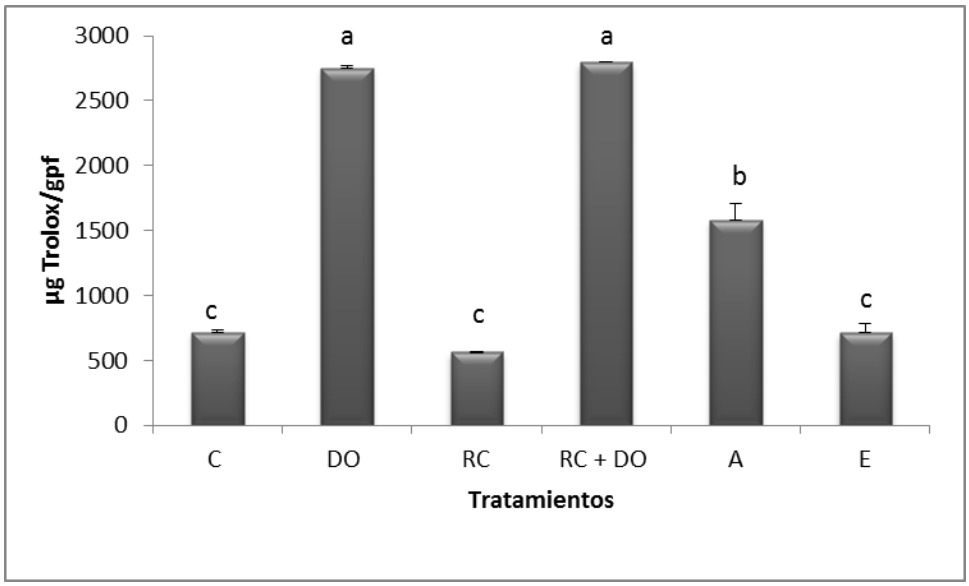


Figura 3. Capacidad Antioxidante de cubos de papa tratados con DO, RC, RC+DO, A, E y Control (C). Medias ± DE. Las mismas letras en las columnas indican que no diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$).

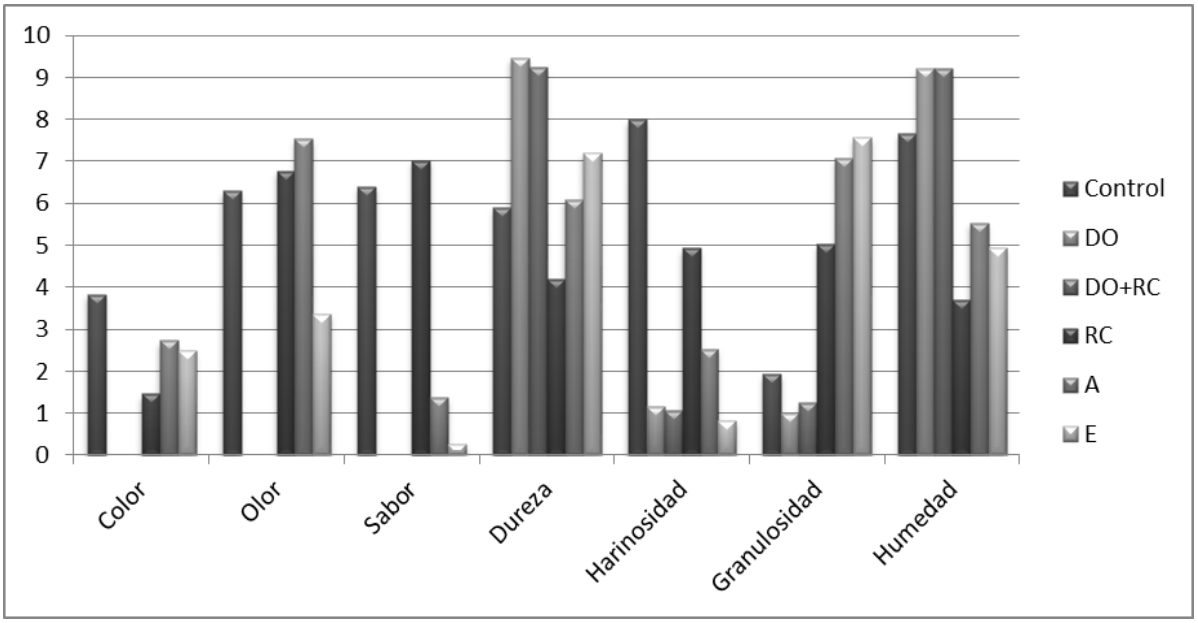


Figura 4. Análisis Sensorial de cubos de papa tratados con DO, RC, RC+DO, A, E y Control (C), sometidos a hervor.

CONCLUSIONES

Los cubos de papas tratados con DO, RC + DO y A luego del tratamiento, tienen una mejor calidad nutricional que las muestras tratadas con E, RC y la muestra control, presentando un mayor contenido de fenoles totales, así como una alta capacidad antioxidante, sin variar la luminosidad de los cubos de papa.

Los cubos de papa conservados mediante las tecnologías de A y E, luego de ser sometidos a hervor presentaron una mejor apariencia global con respecto a los cubos de papa tratados mediante los tratamientos restantes.

Estas tecnologías simples podrían ser aplicadas por pequeñas empresas en el proceso de agregado de valor. Estos resultados contribuyen al desarrollo de nuevas formas de comercialización de productos de papa cortada fresca. El aumento del valor añadido a través de estas tecnologías en productos de papa resulta fácilmente utilizable para el consumidor.

BIBLIOGRAFIA

Angós I, Vírseda P, Fernández T. 2008. Control of respiration and color modification on minimally processed potatoes by means of low and high O2/CO2 atmospheres. Postharvest Biology and Technology, 48: 422-430.

Barat J, Fito P, Chiralt A. 2001. Modelling of simultaneous mass transfer and structural changes in fruits tissue. Journal of Food Engineering, 49: 77-85

Blahovec J, Esmir AS y Valentova H. 2000. Simplified texture profile analysis of cooked potatoes. Int. J. Food Properties, 3: 193-206.

Blessington T. 2005. The Effects of Cooking, Storage, and Ionizing Irradiation on Carotenoids, Antioxidant Activity, and Phenolics in Potatoes (Solanum tuberosum L.). Tesis Master of Science. Texas A&M University. 39-42.

Brand-Willians W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie, 28: 25–30.

Chabanet C. 1999. Statistical analysis of sensory profiling data. Graphs for presenting results (PCA and ANOVA). Food Quality and Preference, 11: 159-162.

FDA. 1994. Sulfiting agents: withdrawal of regulation revoking GRAS status for use on “fresh” potatoes served as sold unpackaged and unlabeled to consumers. U.S.Food and Drug Admin. Fed Reg , 56: 65938-9.

García Procaccini L, Huarte M, Monti MC. 2014. Mantenimiento de la calidad de cortes de papa (Solanum tuberosum L.) refrigerados mediante la utilización de compuestos químicos. VII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha. La Plata.

Garcia Procaccini LM. 2013. Utilización de compuestos químicos para mantener la calidad en cortes de papa refrigerados. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina.

Gómez C, Fiorenza F, Izquierdo L, y Costell E. 1998. Perception of mealiness in apples: a comparison of consumers and trained assessors. Z Lebensm Unters Forsch A, 207: 304-310.

Hoberg E, Ulrich D, y Tiemann H. 1998. Sensory methods for potato evaluation in breeding research. Beiträge zür Züchtungsforschung. BAZ, 4: 67-69.

Infostat. 2016. Software estadistico.

IRAM 20005-1, 1996 y ISO 8586-1, 1993. Análisis sensorial: Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. 34 pp.

Jiang F, Zauberman y Fuchs. 1999. Purification of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. Journal of Science and Food Agriculture, 79: 950-954.

Kidmose U y Hansen M. 1999. The influence of postharvest storage, temperature and duration on the quality of cooked broccoli florets. J. Food Quality, 22: 135-146.

Langdon T. 1987. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. Food technology, 41: 64–67.

Laurita EK y Ahvenainen R. 1998. Shelf life of sliced raw potatoes of various cultivar varieties-substitution of bisulfites. Journal of Food Protection, 64: 1363-1371.

Limbo S y Piergiovanni L. 2006. Shelf life of minimally processed potatoes. Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic acid and citric acids on enzymatic browning. Postharvest Biology and Technology, 37: 254-264

Luning PA, Van Der Vuurst De Vries R, Yuksel D, Ebbenhorst-Seller T, Wichers H y Roozen JP. 1994. Combined instrumental and sensory evaluation of flavor of fresh bell peppers (Capsicum annuum) harvested al three maturation stages. J. Agric. Food. Chem., 42: 2855-2861.

Martin N, Molimard P, Spinnler HE, y Schlich P. 2000. Comparison of odour sensory profiles performed by two independent trained panels following the same descriptive analysis procedures. Food Quality and Preference, 11: 487-495.

Montouto Graña M, Romero Rodríguez MA, Vásquez Odériz ML, Fernández Fernández E. 2000. Evaluación sensorial de la patata de Galicia con denominación específica. Libro de Actas del Congreso Iberoamericano y Desarrollo en Patata. Patata 2000. 3-6 Julio, Vitoria-Gastéis, España, 397-402.

Pastor MV, Costell E, Izquierdo L y Durán L. 1996. Perfil descriptivo de néctares de melocotón. Evaluación de jueces y de atributos con el análisis de Procrustes generalizado. Food Science and Technology International, 2: 219-230.

Pizoccaro F, Torreggini D y Gilardi G. 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. Journal of Food Processing and Preservation, 17: 21–30.

Reppa A, Mandala J, Kostaropoulos A y Saravacos GD. 1999. Influence of solute temperature and concentration on the combined osmotic and air drying. Drying Technology, 17: 1449–1458.

Rocculi O, Gómez Galindo F y Mendoza F.2007. Effect of the application of antibrowning substances on the metabolic activity and sugar composition of fresh-cut potatoes. Postharvest Biology and Technology: 43, 151-157.

Severini C, Baiano A, De Pilli T, Romaniello R y Derossi A. 2003. Prevention of enzymatic browning in sliced potatoes by blanching in boiling saline solutions. Lebensmann-Wisenthal-Technologies, 36: 657-665.

Stone H, Sidel J, Oliver S, Woolsey A y Singleton RC. 1974. Sensory evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. Food Technology, 24-34.

Thybo AK y Martens M. 2000. Analysis of sensory assessors in texture profiling of potatoes by multivariate modelling. Food Quality and Preference, 11: 283-288.

Ulrich D, Hoberg E, Neugebauer W, Tiemann H y Darsow U. 2000. Investigation of the boiled potato flavor by human sensory and instrumental methods. Amer. J. Of Potato Res, 77:111-117.

Van Dijk C, Fischer M, Holm J, Beekhuizen JG, Stoole- Smits T y Boeriu C. 2002. Texture of cooked potatoes (Solanum tuberosum). 1. Relationships between dry matter content, sensory-perceived texture, and near-infrared spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 50 (18): 5082-5088.

Walter JRL. 1977. Enzimatic browning in foods, its chemistry and control. Food Technology in New Zealand, 12: 19-25.

Estudio preliminar del comportamiento reológico de mieles patagónicas

Ciappini M. C., Martinet R., Berho L., Behr C.
CIDTA. Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Rosario. E. Zeballos 1341, Rosario, Santa Fe, Argentina.
rmartinet@frro.utn.edu.ar

RESUMEN

Es conocida la importancia que tiene la viscosidad en las mieles como variable para el diseño de equipos de transporte, mezcla, almacenamiento o bombeo dentro de los procesos industriales Esta propiedad reológica depende, entre otras variables, de la temperatura y la composición. El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades reológicas de muestras de miel utilizando herramientas de rápida resolución. Se utilizó para ello un viscosímetro rotacional SNB-2, con tiempos, velocidad de rotación y temperaturas variables. Se utilizaron seis muestras de miel de distintos orígenes florales, provenientes de la región fitogeográfica patagónica. La dependencia con el tiempo permitió caracterizar el comportamiento del fluido como No Newtoniano. La dependencia con la temperatura se describió a través de los modelos de Arrhenius, de Ley de Potencia y de Vogel-Tamman-Fulcher, de los cuales fue el modelo de Arrhenius el que presentó mejor ajuste. La dependencia de la viscosidad con los parámetros fisicoquímicos no fue concluyente en este estudio.

Palabras clave: miel, viscosidad, reología, fluido no newtoniano

ABSTRACT

It is known the importance of the viscosity of honey as a parameter for the design of transport, mixing, storage and pumping equipment in industrial processes. This rheological property depends, among others, of temperature and composition. The objective of this work was study the rheological properties of different samples of honey using fast resolution tools. For this objective it was used a SNB-2 rotational viscometer, with variable temperature, rotation speed and time. Six samples of floral honeys from the Patagonian phytogeographic province were used. The dependence with time showed that the fluid behavior was Non-Newtonian. The relation with temperature was described through Arrhenius, Power Law and Vogel-Tamman-Fulcher mathematical models,. It was the Arrhenius model which presented the best adjustment. The dependence of viscosity with physicochemical parameters was not conclusive in this study.

Key words: honey, viscosity, rheology, Non Newtonian fluid

INTRODUCCIÓN

El comportamiento reológico de los alimentos es complejo y de notable importancia ya que condiciona algunas operaciones como el transporte por cañerías, la selección de bombas, el diseño de mezcladores, calentadores e intercambiadores, la selección de envases, entre otras. También modifica las propiedades sensoriales de los mismos y por ende, la aceptabilidad en los consumidores.

Dentro de las propiedades reológicas es la viscosidad la que permite caracterizar el tipo de fluido. La viscosidad se evidencia cuando las capas de fluido se desplazan unas respecto de otras, a medida que se aplica un esfuerzo sobre ellas. Esta variación puede darse en varias formas y cada una definirá el tipo de fluido.

Así, se define viscosidad aparente (1), como la relación entre el esfuerzo cortante (Pa) y la velocidad de corte (S^{-1}):

$$\mu = \frac{\sigma}{\gamma} \quad (1)$$

La unidad clásica es el Poise y la más utilizada el centipoise (cP). Los factores que influyen en la viscosidad son la temperatura, la velocidad de deformación, la presión y la composición de la matriz en estudio.
Los fluidos de comportamiento más simples se denominan Newtonianos y en ellos la viscosidad es constante e independiente del esfuerzo, la velocidad de corte y del tiempo, solo es función de la composición y la temperatura. Existen otros comportamientos más complejos que caracterizan a los fluidos como No-Newtonianos. En ellos, el comportamiento depende de múltiples variables, por lo que se subclasifican según su correlación con el tiempo en el que se aplica el esfuerzo cortante, pudiendo ser independientes del tiempo o dependientes del mismo. Entre los primeros están los pseudoplásticos, plásticos de Bingham, plásticos de Casson o dilatantes. En el segundo grupo se encuentran los tixotrópicos, para los cuales la viscosidad disminuye con el tiempo o los reopécticos, para los cuales la viscosidad aumenta con esta variable (Gómez Díaz et al. 2004)
La miel es un producto natural que posee propiedades antioxidantes y aporta dulzor a la dieta (Almaraz et al. 2007, Meda et al 2005). La apicultura argentina se encuentra entre los principales protagonistas del mercado mundial de miel. El país es considerado el cuarto productor en el mundo, luego de China, Turquía y Ucrania; y el segundo exportador detrás del gigante asiático. Estados Unidos y la Unión Europea son los principales compradores de la miel argentina. Japón, Australia, Arabia Saudita, Indonesia, Gran Bretaña y Suiza son otros mercados en los cuales los apicultores argentinos pudieron comercializar sus productos durante el año 2015 (Rabaglio et al. 2015). Las mieles en general presentan una viscosidad elevada, lo que se manifiesta en la resistencia que ofrece al drenado y bombeo durante su recolección y procesamiento. Algunas presentan comportamiento newtoniano (Recondo et al. 2006, Sopade et al. 2002), mientras que otras presentan comportamiento No Newtoniano (Gómez Díaz et al. 2004, Witczak et al. 2011, Dobre et al. 2012).
La viscosidad depende fundamentalmente de la temperatura, disminuyendo notablemente al incrementarse la misma (Recondoet al. 2001, Sopade y col. 2002). También es función de otros parámetros fisicoquímicos como la composición de azúcares (Brenda 2003), el contenido de agua (Abu-Jdayil et al. 2002, Zaitoun et al. 2001) y de coloides (Bhavesh 2002, Brenda 2003). Según informan algunos autores, si la concentración de agua aumenta, disminuye la viscosidad de las mismas; lo inverso ocurre con el contenido de coloides (Al-Khalifa y Al-Arify 1999, Karoui et al 2007).
Existen antecedentes sobre determinaciones de parámetros fisicoquímicos en mieles de diferente origen botánico, los que concluyen que es posible clasificarlas con un 98% de certeza, utilizando sólo tres parámetros: cenizas, acidez total y viscosidad dinámica (Popek 2002, 2003).
La viscosidad también provee una herramienta accesible y rápida para diferenciar mieles de abejas y mieles adulteradas, originadas generalmente a partir de hidratos de carbonos.
En este trabajo se estudió el comportamiento viscosimétrico de mieles florales y su dependencia con la temperatura, con el contenido de humedad y con la conductividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de miel

Como material de estudio se utilizaron seis muestras de miel de distintos orígenes florales, provenientes de la región fitogeográfica patagónica. Previo a los ensayos, se acondicionaron las mismas con tratamiento térmico y homogeneización para eliminar cristales y burbujas de aire que interfieren en las lecturas de viscosidad.
Las mieles se calentaron hasta 50ºC, por espacio de 1 h, a fin de lograr la disolución completa de cualquier tipo de cristal que pudiera existir; luego, se incubaron por 24 h a 30°C, para eliminar las burbujas de aire que interfieren en el análisis. Al finalizar el período de estabilización, se realizaron las determinaciones.

Humedad

Se utilizó un refractómetro marca Atago 211-W08 (AOAC 1995). Las muestras se homogenizaron mecánicamente y luego se calentaron hasta fusión completa de los cristales. Permanecieron en estufa a 30° C por 24 h para eliminar burbujas de aire.

Conductividad
Las determinaciones se realizaron con un conductímetro Horiba D-24, según norma IRAM 15945 (2007). La lectura se hizo sobre una solución de miel anhidra al 20% a 20ºC. El equipo posee un electrodo de inmersión de platino, que permite ajustar el valor de la constante de la celda de conductividad eléctrica y leer directamente la conductividad de la muestra en la determinación.
Caracterización del fluido
Se evaluó el comportamiento de las muestras utilizando un viscosímetro rotacional SNB-2 (resolución η: 0,1 cP.s; rango T: 0-100ºC; resolución T: 0,1ºC; repetibilidad: 0,5%) a velocidad constante de 5 rpm durante 60 minutos con spindle #3.
Viscosidad como función de la temperatura
Se determinó usando viscosímetro rotacional SNB-2 fijando una velocidad de rotación de 5 rpm y variando la temperatura entre 20 y 50°C. El efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente se describió a través de los siguientes modelos matemáticos:
Modelo de Arrhenius: este modelo matemático se expresa por la siguiente ecuación

$$\eta = n_0 e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (2)$$

Donde n_0: es constante inicial de la viscosidad (Pa s), E_A: la energía de activación ($Jmol^{-1}$), R: es la constante de los gases ($J.K^{-1}.mol^{-1}$), T: es la temperatura de trabajo (°K)

Modelo de Vogel-Tamman-Fulcher (VTF): la expresión que representa la viscosidad en este modelo está dada por:

$$n = A\, e^{\left[\frac{B}{T-T_0}\right]} \quad (3)$$

Donde A y B: constantes empíricas; (Pa s) y (ºK) respectivamente, T: temperatura de trabajo (ºK), T_0: temperatura de transición vítrea (ºK)

Ley de la Potencia: se representa con la siguiente expresión

$$n = K\, \gamma^{n-1} \quad (4)$$

Donde μ: viscosidad (Pa s), γ: gradiente de velocidad, n: índice de comportamiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
La **Tabla 1** muestra los resultados de humedad y conductividad de las distintas muestras de miel analizadas.

Tabla 1: Humedad y Conductividad de las muestras de miel

Miel	Humedad g/100g	Conductividad mS/cm
M1	16,2	1372
M2	17,3	727
M3	16,2	697
M4	15,7	799
M5	14,8	450
M6	18,6	541

Las **Figuras 1** y **2** muestran las relaciones de humedad y conductividad con la viscosidad, respectivamente. Se observa que mientras la humedad aumenta, la viscosidad tiene valores oscilantes; lo mismo ocurre para la conductividad. Los datos obtenidos no son suficientes para llegar a conclusiones vinculantes.

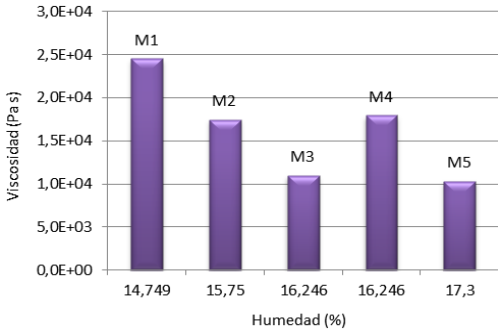


Figura 1: Viscosidad de las mieles en función de la humedad

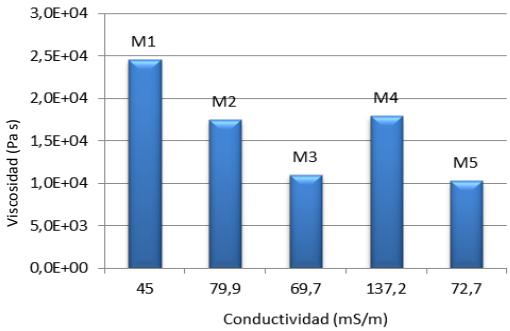


Figura 2: Viscosidad de las mieles en función de la conductividad

El estudio del tipo de fluido se llevó a cabo midiendo la viscosidad en cada una de las muestras, con un gradiente de velocidad constante a través del tiempo. Los resultados experimentales se muestran en la **Figura 3**. En ella se observa que el comportamiento de todas las muestras es no Newtoniano, en coincidencia con lo informado por otros autores (Witczak et al. 2011, Gómez Díaz et al. 2004, Stelmakiene et al. 2012). Las muestras M1, M2, M3, M5 tuvieron un comportamiento tixotrópico, mientras que para las muestras M4 y M6 el comportamiento fue reopéctico.

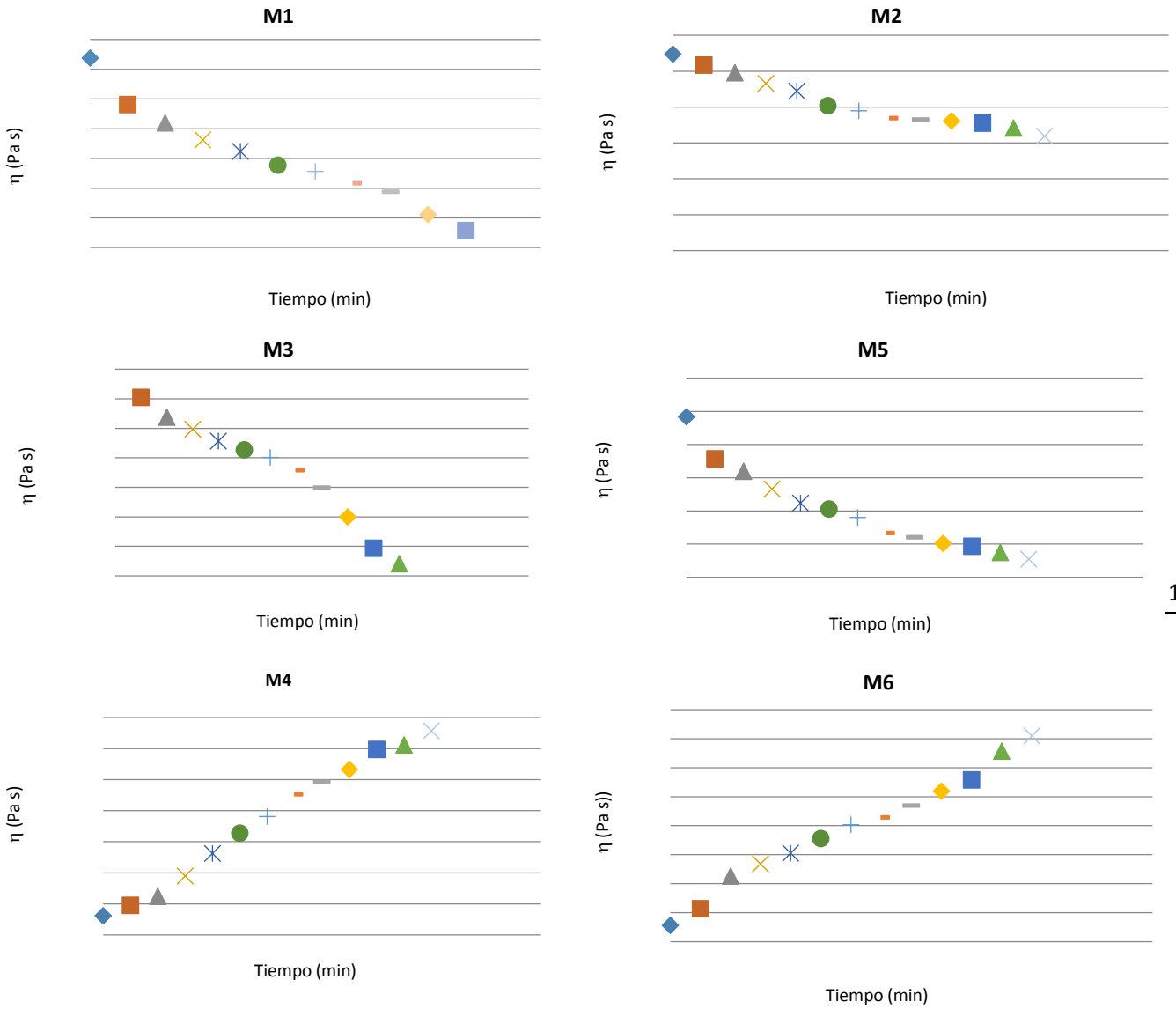


Figura 3. Comportamiento reológico de la miel

La variación de la viscosidad con la temperatura presentó una relación muy estrecha, como lo marcan todos los antecedentes y estas muestras de mieles no son una excepción (Yoo 2004). El comportamiento se muestra en la **Figura 4**. Los valores de viscosidades obtenidos para cada una de las muestras fueron bastante amplios variando de 1700 Pa s a 20000 Pa s.

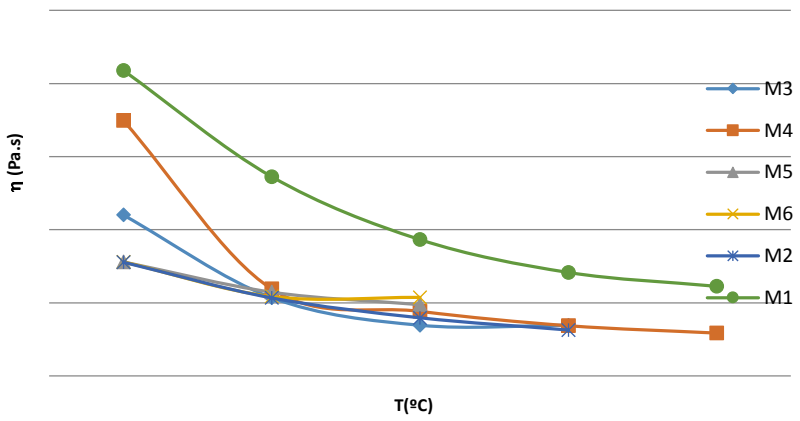


Figura 4. Variación de la viscosidad con la temperatura

Todas las muestras evidencian una disminución brusca de la viscosidad con el aumento de temperatura. La muestra M1presentó valores de viscosidad superiores al resto de las mieles, inclusive a temperaturas elevadas donde los valores tienden a coincidir independientemente de las muestras. En una primera modificación térmica, con rangos de 5ºC, la disminución de viscosidad es abrupta y luego se hace poco representativa hasta llegar a hacerse prácticamente despreciable, siempre respetando el mismo salto térmico. Este comportamiento se evidencia independientemente del tipo de fluido que se trate.
El comportamiento en función de la temperatura se evaluó por ajuste de los resultados con distintos modelos matemáticos, a continuación se explicitan los valores que tomaron los parámetros de cada uno de los modelos matemáticos utilizados. Arrhenius, Ley de la Potencia y VTF, como se indica en la **Tabla 2** (Juszczak et al. 2006, Recondo 2006).

Tabla 2. Parámetros de las ecuaciones de Arrhenius, Ley de Potencia y VTF para el cálculo de la viscosidad de mieles y coeficiente de regresión

Miel	Arrhenius			Ley de Potencia			V-T-F		
	A	E_a (kJmol^1)	R^2	A	B	R^2	A	B	R^2
M1	$1\ 10^{-7}$	63,47	0,99	$7\ 10^{76}$	-28,62	0,99	$4\ 10^{-9}$	10035	0,99
M2	$1\ 10^{-7}$	62,50	0,99	$7\ 10^{74}$	-27,92	0,99	$4\ 10^{-9}$	9875,3	0,99
M3	$1\ 10^{-7}$	63,20	0,95	$2\ 10^{75}$	-28,01	0,95	$4\ 10^{-9}$	9967,4	0,95
M4	$1\ 10^{-7}$	64,20	0,97	$9\ 10^{75}$	-28,23	0,97	$4\ 10^{-9}$	10109	0,97
M5	$3\ 10^{-7}$	61,25	0,97	$1\ 10^{73}$	-27,16	0,97	$1\ 10^{-8}$	9661,1	0,97
M6	$1\ 10^{-7}$	61,35	0,95	$1\ 10^{73}$	-27,35	0,94	$3\ 10^{-9}$	9687,7	0,95

Según lo evaluado tanto el modelo matemático de Arrhenius como el VTF representan el comportamiento de las muestras con un grado similar de ajuste.

CONCLUSIONES

En base a los ensayos realizados sobre las seis muestras de miel de la zona geográfica denominada estepa patagónica, se puede concluir que, respecto a los parámetros humedad y conductividad, si bien los valores de

ambos parámetros están dentro de lo referido en las bibliografías y dentro de los requerimientos normativos para la comercialización, no pudo ser concluyente el estudio para vincularlos con el comportamiento reológico expresado como viscosidad.

Sobre el comportamiento reológico específico, todas las muestras tuvieron un comportamiento no newtoniano y dentro de éste fueron dependientes del tiempo. A su vez, el 66% de las muestras mostraron comportamiento tixotrópico (disminución de la viscosidad de la muestra con el tiempo en que se ejecuta el esfuerzo cortante) como lo evidencian otros autores. El 34% restante de las muestras mostraron comportamiento reopéctico (aumento de la viscosidad con el tiempo en el que se ejecuta el esfuerzo cortante).

Por último la correlación en cuanto al comportamiento de la viscosidad en cada muestra con la variación de la temperatura respetó lo expresado por otros autores en cuanto, la viscosidad disminuyó a medida que la temperatura aumentaba.

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Jdayil B, Abd Al-Majeed G, Al-Malah K I M and Shahera Z. 2002. Heat effect on rheology of light- and dark-colored honey. Journal of Food Engr., 51(1): 33-38

Al-Khalifa, A.S., Al-Arify, I.A. 1999. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. Food Chemistry, 67: 21–25

Almaraz-Abarca, N., da Graça Campos M., Ávila-Reyes J.A., Naranjo-Jiménez N., Herrera Corral J., González-Valdez L.S. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee collected pollen from mesquite (Prosopisjuliflora, Leguminosae). Journal of Food Composition and Analysis, 20: 119-124

AOAC Official Methods of Analysis. 1995. 16 th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, Ch. 44, 40.

Bakier S. 2007. Influence of temperature and water content on the rheological properties of Polish honeys. Pol J Food NutrSci, 57: 17-23.

Bhavesh KP, Bhattacharya S. 2002. Coating with Honey. A Study with Model Solids, J. Food Process Engr, 25(3): 225–232.

Brenda M, Bhesh B, D'Arcy B, Nola C. 2003. Determination of Viscosity of Some Australian Honeys Based on Composition' Int. J. FoodProperties, 6(1): 87 – 97

Dobre I, Georgescu L A, Alexe P, Escuredo O, Seijo M C. 2012. Rheological behavior of different honey types from Romania. Food Res. Int., 49: 126–132

Gómez Díaz D., Navaza J M, Quntáns Riveiro L C. 2004.Estudio viscosimétrico preliminar de mieles de Bosque denominación específica "Miel de Galicia". Ciencia y Tecnología alimentaria, 4:234-239

IRAM 15945. 2007. Miel. Determinación de la conductividad eléctrica. Editado por Instituto Argentino de Normalización y Certificación, Buenos Aires, Argentina.

Juszczak L., Fortuna T. 2006.Rheology of selected Polish honeys.Journal of Food Engineerin, 75: 43–49

Karoui R., Dufour E., Bosset J.O., De Baerdemaeker J. 2007.The use of front face fluorescence spectroscopy

Meda, A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry, 91(3): 571-577

Munro, J. A. 1943. The viscosity and thixotropy of honey. Journal ofEconomic Entomology, 36: 769–777.

Nanda, V., Sarkar, B.C., Sharma, H.K., Bawa, A.S. 2003. Physico chemical properties and estimatios of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. Journal of FoodComposition and Analysis, 16 (5): 613-611.

Pereira, E., A.Queiroz y R. Feitosa. 2003. Comportamentoreológico de mel da abelhaurucu (Melíponascutellaris, L.). Rev. ciênc. exatasnat, 5(2):179-186.

Popek S 2002. A Procedure to Identify a Honey Type, Food Chem, 79(3): 401-406.

Popek, S. 2003. Identification of honey types. Nahrung/Food, 47: 39–40.

Queiroz, A.J., Figueirêdo R.M.F., da Silva C.L. , Mata M.E. 2007.Comportamentoreológico de méis de florada de silvestre. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 11(2): 190-194

Rabaglio M, Castignani H, Sanchez C, Barberis N, Huerta G. 2015. Exportaciones Apícolas de Argentina. Informe INTA PROAPI. Disponible en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-exportacionesapicolas_ de_ argentina junio_2015.pdf.

Recondo M, Elizalde B, Buera M. 2006. Modeling temperature dependence of honey viscosity and of related supersaturated model carbohydrate systems. Journal of Food Engineering, 77: 126–134

Sopade PA, Halley P, Bhandari B, DArcy B, Doebler C, Caffin N. 2002. Application of the Williams–Landel–Ferry model to the viscosity–temperature relationship of Australian honeys. Journal of Food Engineering, 56: 67–75

Steffe, J.F. 1996. Rheological Methods in Food Process Engineering, Second Edition.USA: East Lansing. Freeman Press

STELMAKIENĖ A, RAMANAUSKIENĖ K, BRIEDIS V ANDLESKAUSKAITĖ D. 2012.Examination of rheological andphysicochemical characteristics in Lithuanian honey.Afric J Biotech, 11: 12406-12414

to classify the botanical origin of honey samplesproduced in Switzerland. FoodChemistry, 101:314–323.

WitczakM, Juszczak L, Gałkowska D.2011. Non-Newtonian behaviour of heather honey. Journal of Food Engineering, 4: 532–537

Yanniotis S, Skaltse S, Karaburnioti S. 2006 Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperature. Journal of Food Engineering, 72: 372-377

Yoo B. 2004 Effect of temperature on dynamic rheology of Korean honeys. Journal of Fod Engineering, 65:459-463

Zaitoun S, Ghzawi A, Al Malah K, Abu-Jdayil B. 2001. Rheological properties of selected light colored Jordaniana honey. International Journal of Food Properties, 4: 149-148

Influencia de la temperatura en la viscosidad de mieles florales y características fisicoquímicas

Ciappini M.C.[(1)], Martinet R.[(1)], Stoppani F.S.[(1)], Alvarez M.B.[(1)]

(1)CIDTA - Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina
rmartinet@frro.utn.edu.ar

RESUMEN

La caracterización de mieles mediante sus propiedades palinológicas, fisicoquímicas y sensoriales, ha recibido mucha atención en los últimos tiempos. Sin embargo, sus propiedades reológicas no han sido adecuadamente estudiadas y difundidas hasta el momento. Sus características reológicas constituyen parte de la información que permite realizar los cálculos necesarios para la ingeniería de procesos, tipificar sustancias y caracterizar texturas, que afectan la calidad sensorial de un producto alimenticio. La viscosidad de la miel se ve influenciada por la temperatura, el contenido de humedad, la composición química y la presencia de cristales y coloides. El objetivo de este trabajo fue estudiar la viscosidad en mieles florales y la influencia de la temperatura sobre ella. Esta dependencia fue descripta usando los modelos de Arrhenius y la Ley de Potencia. También se estudiaron propiedades fisicoquímicas tales como humedad, conductividad, pH, acidez, color y perfil de azúcares. Para temperaturas que varían entre 30ºC y 55ºC, el modelo de Arrhenius fue el que mejor interpretó los valores de viscosidad y se puede emplear de manera satisfactoria para describir el comportamiento de mieles florales. No se encontraron diferencias significativas en la energía de activación para las mieles ensayadas, por lo que no se pudo establecer una correlación con los parámetros fisicoquímicos determinados.

Palabras Clave: Miel; Viscosidad; Temperatura; Propiedades Fisicoquímicas

ABSTRACT

The characterization of honeys by their palynological, physicochemical and sensory properties, has received much attention in recent times. However, its rheological properties have not been adequately studied and disseminated so far. Its rheological characteristics are part of the information that allows the necessary calculations for process engineering, enable substances typify and characterize textures that affect the sensory quality of a food product. The temperature, moisture content, composition and the presence of colloids and crystals, influences the viscosity of honey. The aim of this work was to study the viscosity in floral honeys and the influence of temperature on it. This dependence was described using the Arrhenius model and Power Law. Physicochemical properties such as moisture, conductivity, pH, acidity, color and sugar profile were also studied. For temperatures ranging between 30 °C and 55 °C, the Arrhenius model was the best interpreted viscosity values and can be used successfully to describe the behavior of floral honeys. No significant difference in the Ea for the tested honeys was found, so it could not establish a correlation with certain physical and chemical parameters.

Key words: Honey; viscosity; temperature; physicochemical properties

INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento que se consume directamente o se utiliza como materia prima para diversos fines. La caracterización de mieles mediante sus propiedades palinológicas, fisicoquímicas y sensoriales, ha recibido mucha atención en los últimos tiempos. También ha tenido especial relevancia el estudio de su capacidad antioxidante, a través de la determinación de compuestos fenólicos y flavonoides. Sin embargo, las propiedades reológicas de las mieles argentinas de distinto origen geográfico y/o botánico, no han sido adecuadamente estudiadas y difundidas hasta el momento.

Entendemos a los fluidos como sustancias que se deforman ante la aplicación de esfuerzos cortantes. Sus características reológicas son un criterio que permite, en el ámbito industrial, realizar cálculos necesarios para ingeniería de procesos, que implican el diseño de tuberías, bombas, mezcladores, intercambiadores de calor, homogeneizadores y envasadoras. También permiten tipificar sustancias, identificar productos y caracterizar texturas, que afectan la calidad sensorial de un producto alimenticio.

La miel es un material viscoso a temperatura ambiente, se emplea en la industria como ingrediente alimentario o se la envasa para consumo, en su estado natural o pasteurizada. Ha sido caracterizada como un fluido newtoniano por la mayoría de los autores (Juszczak y Fortuna 2006, Recondo et al. 2006, Bakier 2007, Cohen y Weihs 2010, Saxena et al. 2014). Otros, en cambio, le atribuyen un comportamiento no newtoniano (Mossel et al. 2000). Mieles de brezo (*Calluna vulgaris*), de trigo sarraceno (*Fagopyrumes culentum*), de trébol blanco (*Trifolium repens*), la miel de manuca originaria de Nueva Zelanda (*Leptospermums coparium*) y la miel de karvi de la India (*Carvia callosa*), han mostrado un comportamiento tixotrópico (Witczak et al. 2011); mientras que mieles de Nigeria (*Opuntia engelmanni*) y de Australia (*Eucalyptus*), han sido calificadas como fluidos dilatantes (Yanniotis et al. 2006). El comportamiento no newtoniano ha sido atribuido a la presencia de dextrinas de alto peso molecular o de coloides (Dobre et al. 2012).

La viscosidad de la miel depende fundamentalmente de la temperatura (Cohen y Weihs 2010), pero también se ve afectada por otros factores físicos, tales como la presencia de cristales o coloides, del contenido de humedad, tipo y proporción de azúcares (Bakier 2007). Esta dependencia con la composición, ha permitido también proponer a este parámetro, como indicador del origen geográfico y botánico de las mieles (Wei et al. 2010) y de posibles adulteraciones (Kamboj y Mishra 2015).

El modelo de Arrhenius y la Ley de Potencia han sido ampliamente usados para estudiar la dependencia de esta propiedad con la temperatura; han demostrado su utilidad para su aplicación en la relaciones viscosidad-temperatura en los sistemas alimentarios (Bakier 2007).

La transición vítrea se produce cuando un material cambia desde el estado gomoso al estado vítreo durante el enfriamiento y la temperatura a la que esto ocurre se denomina temperatura de transición vítrea (Tg). Para la miel, Tg se encuentra comprendida entre -51°C y -38°C (Sopade et al. 2002, Lazaridou et al. 2004, Recondo et al. 2006). Si bien el comportamiento de la viscosidad de la miel entorno a Tg puede resultar de interés cuando la miel constituye un ingrediente en alimentos congelados, en general, su aplicación en los procesos industriales, se encuentra cercana a la temperatura ambiente. Por otra parte, la miel no puede exponerse a temperaturas superiores a los 60°C, para evitar modificaciones fisicoquímicas, que se consideran adulteraciones (SAGPyA 2007).

Este estudio investigó la dependencia de la viscosidad con la temperatura en mieles monoflorales de distinto origen, para los rangos de temperatura de mayor interés en la industria, aplicando los modelos de Arrhenius y la Ley de Potencia. También se estudiaron algunas propiedades fisicoquímicas de la miel: humedad, conductividad, pH, acidez, color y perfil de azúcares, para establecer posibles correlaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material de estudio consistió en seis muestras de mieles provenientes de la provincia fitogeográfica pampeana y del delta medio del río Paraná. En ensayos preliminares, se estableció su comportamiento newtoniano y su condición de mieles florales (Ciappini et al. 2015).

El contenido de humedad de cada una de las muestras se midió de acuerdo a la norma IRAM 15931 (2007), utilizando un Refractómetro Atago FG-106c, debidamente calibrado con aceite dióptrico de referencia.

La determinación de la conductividad eléctrica se realizó en base a la norma IRAM 15945 (2007) con un conductímetro HORIBA Modelo D-24E con electrodo de inmersión de platino, que permite ajustar el valor de la constante de la celda de conductividad eléctrica, para poder leer directamente la conductividad de la muestra en la determinación. La celda posee un termómetro incorporado, de modo que introduciendo el factor de corrección de temperatura, el equipo proporciona automáticamente el valor de la conductividad a 20°C. Para el análisis, se utilizó una muestra de miel homogeneizada y fundida, libre de impurezas, preparando con ella una solución de 20 g de miel anhidra en 100 ml de agua bidestilada. Se leyó la

conductividad eléctrica en mS/cm, sumergiendo el electrodo en 40 ml de la solución de miel antes descripta.
El pH se midió con un pHmetro Adwa AD 1000, según IRAM 15938 (2007). Se diluyeron 10 g de miel en 100 ml de agua bidestilada y sobre esta solución se leyó el pH con el equipo previamente calibrado con patrones de pH 4 y 7. La acidez se determinó según la norma IRAM 15933 (2013). Se pesaron 10 g de muestra, se disolvieron con 75 ml de agua bidestilada y se determinó su acidez mediante titulación con solución valorada de hidróxido de sodio 0,1 N.
El color se midió utilizando un colorímetro Hanna Modelo C221 (Honey Color Instrument, Italia), de acuerdo a la Norma IRAM 15941-3 (2016).
El perfil de azúcares se llevó a cabo siguiendo la norma IRAM 15946 (2008). El método consiste en la determinación de azúcares: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, en una solución acuosa de miel filtrada, utilizando HPLC de fase inversa por modificación del índice de refracción. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu LC-10AS de fase líquida con detector de índice de refracción RID–10A termostatizado, horno CTO-10A, provisto de una columna SUPELCOGEL Carbohydrate Aminex HPX 87 C Biorad (Ca++). La señal se comparó con la correspondiente a niveles de concentración conocida y el resultado se expresó en g en 100 g. Para generar los valores de referencia, se pesaron 3,804 g de fructosa, 3,010 g de glucosa, 0,602 g de sacarosa y 0,602 g de maltosa (SIGMA Aldrich, St. Louis, MO), que se disolvieron individualmente en 100 ml de agua desionizada y filtrada por membrana 0,22 μm, pH = 5,7 y Conductividad = 0,8 μS/cm. Para el análisis de las mieles, se prepararon soluciones al 10% P/V (5 g de miel en 50 mL), pesando la miel y disolviéndola en agua destilada con agitación magnética. La solución se filtró (Filtro de membrana Dynagard o 3 M Ø=0,45 mm), previo a la inyección a loop completo.
Previo a los ensayos de viscosidad, las mieles se calentaron hasta 50ºC por espacio de 1 h, a fin de lograr la disolución completa de los cristales; luego, las muestras se incubaron por 24 h a 30°C, para eliminar las burbujas de aire que pudieran interferir en la determinación de la viscosidad. Al finalizar el período de estabilización, se realizaron las determinaciones por triplicado y se utilizaron los valores promedio.
Para las determinaciones de viscosidad, se utilizó un viscosímetro rotacional SNB-2 (resolución: 0,1 cP s; rango T: 0-100ºC; resolución T: 0,1ºC; repetibilidad: 0,5%). Los ensayos se hicieron con spindles #2 y #3, a una velocidad de rotación de 20 rpm. El rango de temperaturas empleado estuvo comprendido entre 30°C y 55°C. Las mediciones se realizaron en el proceso de enfriamiento de las muestras, utilizando una celda termostatizada, para mantener estables las temperaturas de trabajo.
La dependencia de la viscosidad con la temperatura fue descripta usando los siguientes modelos:

Modelo de Arrhenius

$$\eta = \eta_o \exp(E_a/RT) \quad (1)$$

Donde η es la viscosidad (Pa s); η_o es la viscosidad a una temperatura de referencia, que ciertos autores han tomado como "temperatura infinita" (Pa s); Ea es la energía de activación o barrera de energía para fluir (J/mol); R es la constante general de los gases (J/mol K) y T, la temperatura absoluta (K).

Modelo de la Ley de la Potencia

$$\eta = A \,.\, \left(T - T_g\right)^B \quad (2)$$

Donde η es la viscosidad en (Pa s); A es una constante (Pa s); B, una constante adimensional y Tg, la temperatura de transición vítrea (K).
Se calculó la desviación media porcentual (AAD %), definida como se indica en la Ecuación (3), con el fin de comparar los datos experimentales de viscosidad a las distintas temperaturas, con el valor calculado, aplicando los distintos modelos (Sopade et al. 2002, Juszczak y Fortuna 2006).

$$\text{AAD } \% = \frac{1}{n}\sum \frac{\left|\eta_{exp} - \eta_{calc}\right|}{\eta_{exp}} \,.\, 100 \quad (3)$$

Donde η_{exp} es la viscosidad medida experimentalmente y η_{calc} es la viscosidad calculada mediante un modelo matemático.

Para el análisis estadístico correspondiente a la caracterización de las muestras se utilizó el paquete estadístico Excel (2007). Se utilizó ANOVA para establecer diferencias significativas en la energía de activación de cada miel en particular (Excel 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se presentan los valores obtenidos de humedad, color, conductividad, acidez y pH.

De acuerdo a los parámetros de calidad recomendados por el Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de la Miel, Resolución GMC Nº 056/99, el contenido de humedad de la miel no debe superar 20 g/100g y la acidez debe ser inferior a 40 mEq ácido/kg, la sacarosa menor al 5% y el contenido aparente de azúcares reductores no menor al 65%, por lo que las mieles ensayadas cumplían con los parámetros de calidad recomendados.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las mieles ensayadas.

Miel	**Humedad** g/100g	**Color** mm Pfund	**Conductividad** mS/cm	**Acidez** mEq/kg	**pH**
M1	17,6	70	230	18,9	4.1
M2	18,2	99	277	21,3	3,9
M3	18,3	150	332	28,2	4,1
M4	17,2	103	931	36,3	4,5
M5	17,6	150	265	11,2	4,2
M6	19,4	72	193	16,2	4,2

En la **Figura 1** se muestran los diagramas de caja y bigotes, que representan el contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa de todas las muestras de mieles ensayadas. Se indican el mínimo y el máximo (línea vertical), la mediana (línea horizontal central) y el primer y tercer cuartiles (cuadro). Se observa el predominio de la fructosa y la glucosa, característico de las mieles florales, seguidas por la sacarosa y la maltosa.

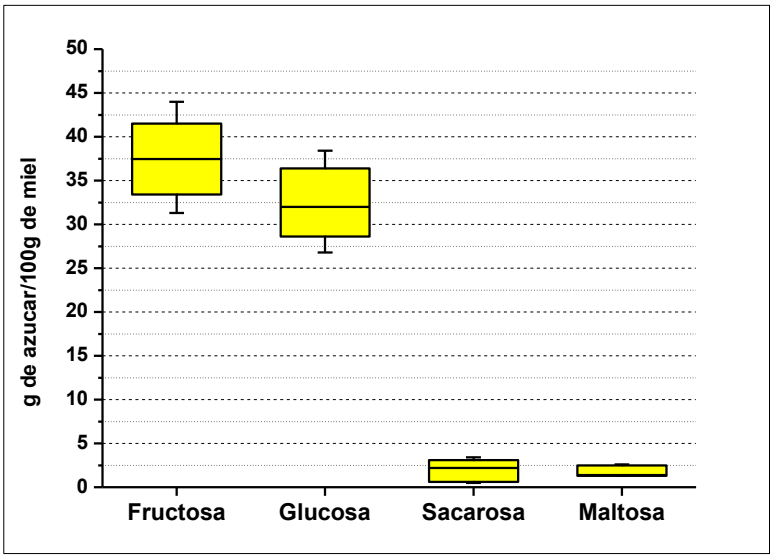


Figura 1. Diagrama de caja y bigotes para el contenido de azúcares de las mieles ensayadas

La variación de la viscosidad con la temperatura para las mieles en estudio, se muestra en la **Figura 2**, en la que se puede observar que los valores de viscosidad disminuyen cuando la temperatura aumenta, probablemente, debido a la menor fricción molecular y a la reducción de las fuerzas hidrodinámicas (Mossel et al. 2000). Para temperaturas superiores a 50°C, todas las mieles se aproximan a un mismo valor de viscosidad constante, en coincidencia con lo informado por otros autores (Mossel et al. 2000, Sopade et al. 2002, Gómez Díaz et al. 2009). Particularmente, Juszczak y Fortuna (2006), encontraron que las mayores diferencias en los valores de viscosidad para mieles de distinto origen, se producían a 10°C.

Si se observan los valores de viscosidad obtenidos a 40°C, se aprecia que los mismos están comprendidos entre 1,3 y 3,0 Pa s; Zaitoun et al. (2001) informaron un rango algo más amplio de variación (entre 2,25 a 4,77 Pa s) a esa temperatura; el máximo valor alcanzado para mieles polacas fue igual a 3,5 Pa s (Juszczak y Fortuna 2006), mientras que para mieles australianas e indias, los valores fueron inferiores (Sopade et al. 2002, Al-Malah et al. 2001).También resultaron inferiores los valores de viscosidad para mieles de origen chino; explicándose este comportamiento en función de la elevada humedad que presentaban esas muestras (Juszczak y Fortuna 2006).

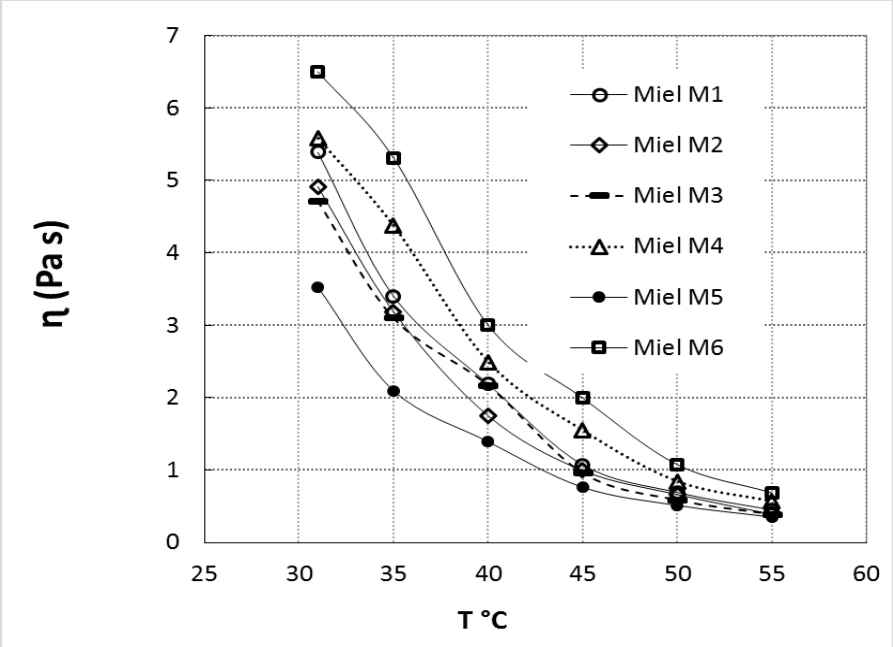


Figura 2. Variación de la viscosidad (Pa s) con la temperatura para mieles florales.

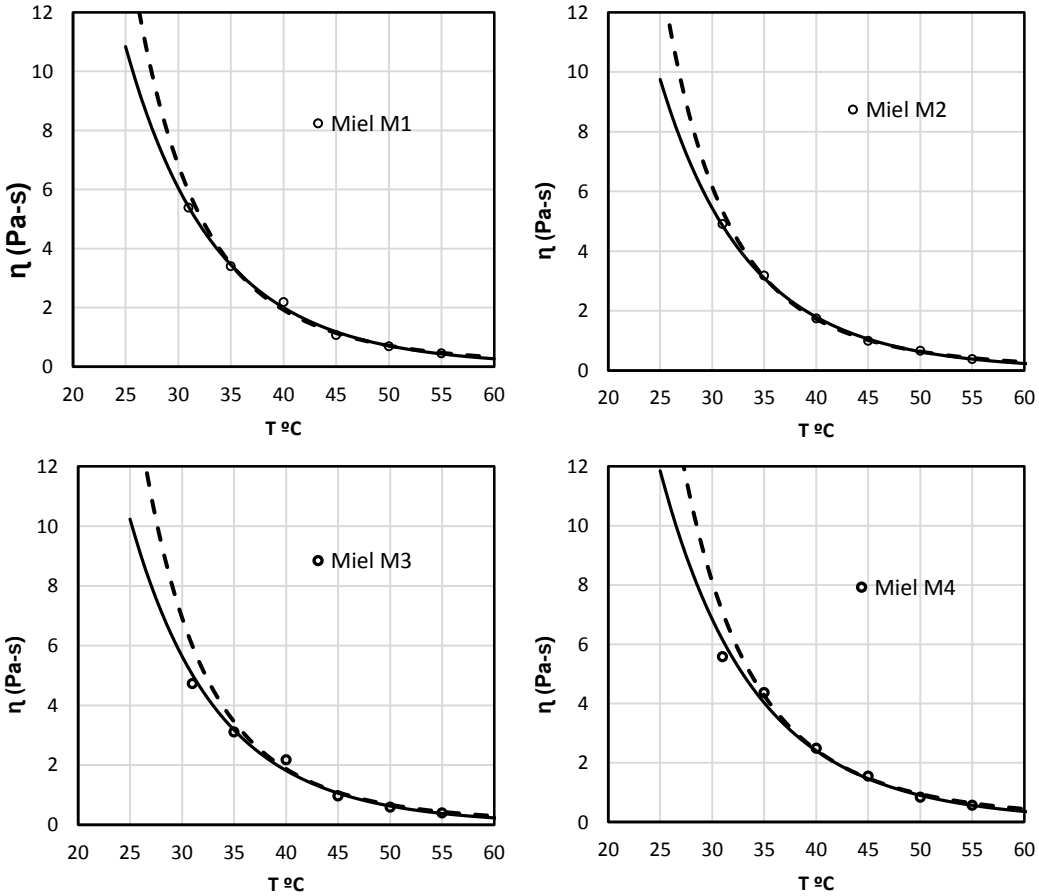
En la **Tabla 2**, se resumen los parámetros de ajuste de la Ley de la Potencia (Ecuación 2) y los correspondientes a los modelos de Arrhenius (Ecuación 1). Los valores para la energía de activación y para las constantes A, B y C, coincidieron con lo informado por otros autores (Sopade et al. 2002) o resultaron levemente superiores (Recondo et al. 2006, Santos et al. 2014).

Tabla 2. Parámetros de ajuste de los modelos de Ley de la Potencia y de Arrhenius para la variación de la viscosidad de mieles florales con la temperatura

Miel	Ley de Potencia			Arrhenius		
	A	B	AAD	η_0	E_a	AAD
	Pa s		%	Pa s	KJ mol^{-1}	%
M1	2,11 x 10^{+17}	-8,90	4,2	5,16 x 10^{-15}	87,46	4,5
M2	2,04 x 10^{+17}	-8,92	5,5	4,38 x 10^{-15}	87,60	4,7
M3	5,96 x 10^{+17}	-9,14	16,2	2,21 x 10^{-15}	89,42	9,8
M4	3,36 x 10^{+16}	-8,43	10,3	4,19 x 10^{-14}	82,48	7,8
M5	5,18 x 10^{+15}	-8,14	6,4	6,46 x 10^{-14}	79,84	4,9
M6	3,31 x 10^{+16}	-8,18	11,0	1,16 x10^{-13}	80,35	9,2

Como se observa en la **Tabla 2**, la AAD (Ecuación 3) estuvo comprendida entre 4,5% y 9,8%, cuando se aplicó el modelo de Arrhenius, en coincidencia con lo informado para mieles australianas (Sopade et al.

2002), pero superando lo encontrado para mieles polacas (Juszczak y Fortuna 2006). Constituyen los menores valores encontrados para AAD, indicando las menores desviaciones entre los valores experimentales y los calculados y, por ende, poniendo de manifiesto que el modelo de Arrhenius es el que mejor ajustó la modificación de la viscosidad de estas mieles florales, en este rango de temperaturas.
Como sugiere Mossel et al. (2000), el modelo de Arrhenius resulta más apropiado para temperaturas alejadas de T_g, mientras que las desviaciones aumentarían cuando las temperaturas disminuyen.
De acuerdo a Yoo (2004), la Ea disminuye con el aumento de la humedad, indicando que la viscosidad es más sensible a los cambios de temperatura para menores contenidos de agua en la miel. En este trabajo, no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para Ea (**Tabla 1**), por lo que no se estudió su relación con la humedad o con otras propiedades fisicoquímicas de las muestras de miel ensayadas.



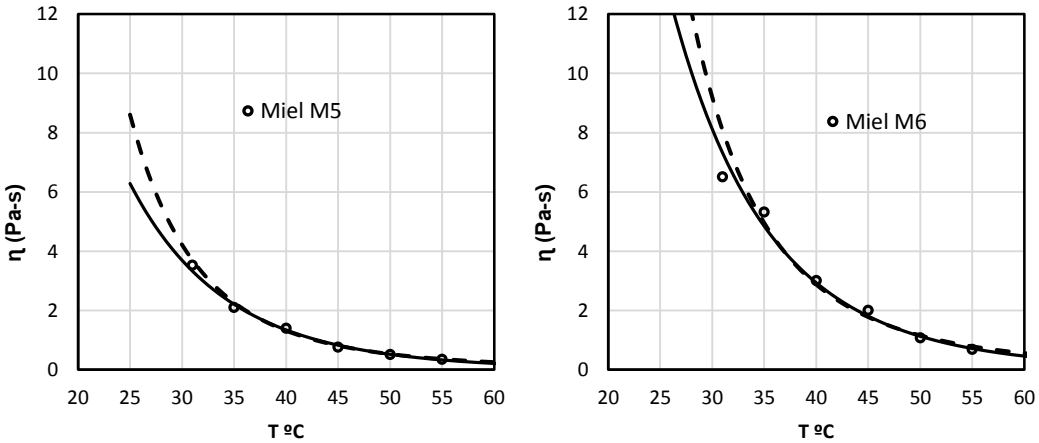


Figura 3. Ajuste de los modelos, Ley de potencia (----) y de Arrhenius (__) a los datos experimentales de viscosidad en función de la temperatura.

En la **Figura 3** se muestra la aplicación de los modelos matemáticos propuestos, para las distintas mieles bajo estudio. Se observa que para temperaturas inferiores a 40°C, los modelos presentaron desviaciones, en coincidencia con lo informado por Mossel et al. (2000), cuando aseguró que cuanto más baja es la temperatura, mayores son las desviaciones.

CONCLUSIONES

Para temperaturas que varían entre 30ºC y 55ºC, el modelo de Arrhenius fue el que mejor interpretó los valores de viscosidad y se puede emplear de manera satisfactoria para describir el comportamiento de mieles florales. No se encontraron diferencias significativas de la Ea entre las mieles ensayadas, por lo que no se pudo establecer una correlación con los parámetros fisicoquímicos determinados.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Malah KIM, Abu-Jdayil B, Zaitoun S, Al-Majeed Ghazwi A. 2001. Application of WLF and Arrhenius kinetics to rheology of selected dark-colored honey. Journal of Food Process Engineering, 24: 341–357.

Bakier S. 2007. Influence of temperature and water content on the rheological properties of polish honeys. Polish Journal of Food Nutrition and Science, 57(2A): 17-23.

Ciappini MC, Martinet R, Stoppani F, Alvarez M. 2015. Primera aproximación al estudio del comportamiento reológico de mieles florales. Libro de Resúmenes del XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CYTAL 2015. AATA. p 126.

Cohen I, Weihs D. 2010. Rheology and microrheology of natural and reduced-calorie Israel honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. Journal of Food Engineering, 100(2): 366-371.

Dobre I, Georgescu I, Alexe P, Escuredo O, Seijo M. 2012. Rheological behavior of different honey types from Romania. Food Research International, 49 (1): 126-132.

Gómez Díaz D., Navaza J.M., Quintáns-Riveiro L. 2009. Effect of Temperature on the Viscosity of Honey. International Journal of Food Properties, 12 (2): 127-143.

Norma IRAM 15931. 2007. Miel. Determinación de la humedad por refractometría. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15933. 2013. Miel. Determinación de la acidez libre. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15938. 2007. Miel. Determinación del pH. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15945. 2007. Miel. Determinación de la conductividad eléctrica. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15941-3. 2016. Miel. Parte 3 - Determinación del color, mediante el colorímetro Hanna para miel. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15946. 2008. Miel. Determinación del contenido de los sacáridos fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Juszczak L, Fortuna T. 2006. Rheology of selected Polish honeys. Journal of Food Engineering, 75: 43-49.

Kamboj U, Mishra S. 2015. Prediction of adulteration in honey using rheological parameters. Journal of Food Properties, 18: 2056-2063.

Lazaridou A, Biliaderis CG, Bacandritsos N, Sabatin, AG. 2004. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. Journal of Food Engineering, 64: 9-21.

Mossel B, Bhandari B, DArcy B, Caffin N. 2000. Use of Arrhenius model to predict rheological behaviour in some Australian honeys. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 33: 545-552.

Recondo M, Elizalde B, Buera M. 2006. Modeling temperature dependence of honey viscosity and of related supersaturated model carbohydrate systems. Journal of Food Engineering, 77: 126-134.

Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de la Miel, Resolución GMC Nº 056/99.

Santos F, Dantas Filho A, Leite R, Aroucha E, Santos A, Oliveira T. 2014. Rheological and some physicochemical characteristics of selected floral honeys from plants of caatinga. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 86: 981-994.

SAGPyA. 2007. Protocolo de Calidad para Miel Fraccionada Argentina. Resolución N° 47/2007. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Disponible en: www.minagri.gob.ar/dimeagro/regimenes.../ circ_nro_MY_1-07.pdf.

Saxena S, Panicker L, Gautam S. 2014. Rheology of Indian Honey: Effect of Temperature and Gamma Radiation. International Journal of Food Science, vol. 2014, pp. 935129.
Sopade PA, Halley P, Bhandari B, D_Arcy B, Doebler C, Caffin N. 2002. Application of the Williams–Landel–Ferry model to the viscosity–temperature relationship of Australian honeys. Journal of Food Engineering, 56: 67-75.
Wei Z, Wang J, Wang Y. 2010. Classification of monofloral honeys from different floral origins and geographical origins based on rheometer. Journal of Food Engineering, 96: 469-479.
Witczak M, Juszczak L, Gałkowska D. 2011. Non-Newtonian behaviour of heather honey. Journal of Food Engineering, 104 (4): 532-537.
Yanniotis S, Skaltsi S, Karaburnioti S. 2006. Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. Journal of Food Engineering, 72: 372-377
Yoo B. 2004. Effect of temperature on dynamic rheology of Korean honeys. Journal of Food Engineering, 65: 459-463.
Zaitoun S, Al-MajeedGhazwi A, Al-Malah KIM., Abu-Jdayil B. 2001. Rheological properties of selected light colored Jordanian honey. International Journal of Food Properties, 4: 139-148.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad Tecnológica Nacional (Proyecto ALUTIRO0002122TC).

Evaluación poscosecha de variedades de ciruelas para uso en la industria de los alimentos

Corbino. G[1]. Valentini. G[1]. Murano. M[2]. Domanino. R[2]

(1) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - San Pedro. Ruta 9. Km 170[1]
(2) Instituto Nacional de Tecnología Industrial - Agroalimentos. Av. Gral. Paz 5445 San Martín Bs As[2]

RESUMEN

Los ciruelos son un grupo numeroso y diverso de especies frutales. Ellos poseen el potencial para contribuir a la nutrición humana debido a su riqueza en fibras y antioxidantes. El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros físico-químicos de calidad y analizar la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas de cultivares de ciruelos producidos en San Pedro, con el fin de revalorizar la producción local y evaluar su posible utilización en la industria de los alimentos. La capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales fue superior en los ciruelos sanguíneos, de piel y pulpa roja, *Ruby Sweet* (RS) y *Casita de Chocolate* (CC) respecto aquellos de piel y pulpa amarilla *Blanco Pavón Arriba* (BPA) y *Byron Gold* (BG). Hubo diferencias significativas en el contenido de antocianinas entre los cultivares rojos, obteniéndose mayores valores para CC. Los resultados sugieren que los ciruelos rojos podrían ser considerados una materia prima interesante para obtener compuestos bioactivos de aplicación en la industria de los alimentos.

Palabras clave: Ciruelas, fenoles, antioxidantes, compuestos bioactivos, antocianinas

ABSTRACT

Plums are the most numerous and diverse group of fruit tree species. They have the potential to contribute to human nutrition because of their richness in fibre and antioxidants. The aims of this study were to determine quality attributes and to analyze the antioxidant activity, the content of phenolic compounds and anthocyanins of plum cultivars produced in San Pedro, in order to revalue local production and assess their possible use in the food industry. The antioxidant capacity and the content of phenolic compounds of the blood plum, red skin and red flesh, *Ruby Sweet* (RS) and *Casita de Chocolate* (CC) are greater than yellow cultivars *Blanco Pavón Arriba* (BPA) and *Byron Gold* (BG). There were significant differences among red cultivars in anthocyanin content, obtaining greater values for CC. The results suggest than the red plums could be interesting row material to obtain chemicals to apply in the food industry.

Keywords: Plums, phenols, antioxidants, bioactive compounds, anthocyanins

INTRODUCCIÓN

San Pedro (Provincia de Buenos Aires) es una zona tradicionalmente frutícola. La superficie dedicada al cultivo de ciruelo ha ido disminuyendo paulatinamente en los últimos años. Esto se debe a la rápida expansión de los cultivos extensivos como la soja, a la baja rentabilidad de la especie y a la falta de destinos comerciales alternativos. Actualmente, una parte de la producción (30%) de ciruela fuera del estándar comercial, no se cosecha, constituyéndose en un remanente.

Los ciruelos son un grupo numeroso y diverso de especies frutales (Blazek 2007). Su fruto es una fuente de azúcares simples, fibras, taninos y minerales. Es rico es pectinas, sorbitol y contiene diversos fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides y antocianinas (Fu et al. 2011, Kim et al. 2003, Stacewicz-Sapuntzakis et al. 2001). Entre los diversos cultivares pueden encontrarse variaciones de estos compuestos (Vasantha Rupasinghe et al. 2006). Las variedades tipo japonesas (*Prunus salicina*) poseen frutos de piel o pulpa amarilla o rojiza. Las variedades de piel y pulpa roja, llamadas sanguíneas, poseen colores rojos, morados y azules muy atractivos, debido a la presencia de pigmentos antociánicos (Fanning et

al. 2014).
Las variedades tipo japonesas, en general, se utilizan para consumo en fresco. Para este uso, la concentración de sólidos solubles y la acidez son parámetros determinantes para la aceptación, por parte del consumidor, del producto en fresco (Crisosto 2004). Los compuestos fenólicos presentes en estas variedades podrían ser utilizados como antioxidantes naturales en alimentos funcionales (Li et al.2016). El intenso color rojo de los extractos de las variedades sanguíneas poseen un potencial uso como colorante rojo natural en alimentos (Fanning et al.2014). Presentan mayor firmeza que los ciruelos europeos (*Prunus doméstica*), utilizados habitualmente para la industria del deshidratado y la elaboración de mermeladas y dulces (Valero et al. 2012). La consistencia, el estado de madurez, el color y el contenido de pectinas naturales, son características de la materia prima a tener en cuenta para la elaboración de una mermelada.
El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros físico-químicos de calidad y analizar la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas de cultivares de ciruelo tipo japonés producidos en San Pedro, con el fin de revalorizar la producción local y evaluar su posible utilización en la industria de los alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Los reactivos 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox y Folin-Ciocalteu, fueron adquiridos en la firma Sigma-Aldrich (Argentina). El ácido gálico se compró en Fluka (Argentina). Cloruro de potasio, acetato de sodio, carbonato de sodio anhidro, ácido cítrico, metanol y el etanol pertenecen a la marca Cicarelli.

Material vegetal

Frutos de ciruelas de pulpa y piel morada *Casita de Chocolate* (CC) *y Ruby Sweet* (RS) y de pulpa y piel amarilla *Blanco Pavón Arriba* (BPA) *y Byron Gold* (BG) fueron cosechados de plantas cultivadas en lotes experimentales pertenecientes a la Estación Experimental Agropecuaria de INTA San Pedro (Buenos Aires, Argentina 330 44´ 34.7´ S, 590 47´ 34.4´´ W), en enero de 2016. Quince (15) ciruelas de cada variedad fueron seleccionadas al azar entre las cosechadas, las cuales fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su análisis.

Parámetros de calidad

A los frutos seleccionados se les determinaron los parámetros físico-químicos peso (P), color de la piel, firmeza (F), pH, sólidos soluble totales (SST) y acidez titulable (AT). Las medidas de color fueron realizadas con un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Osaka, Japan), en la zona ecuatorial del fruto, sobre el sitio opuesto a la sutura. Se utilizó el sistema de color CIELAB (Commission Internationale de IÉclairage) y se obtuvieron los valores L*(luminosidad), a* b* y el C*(chroma). La firmeza se midió en dos lados opuestos, sobre la zona ecuatorial del fruto, con un durómetro digital Bareiss HPE (Alemania) y se expresó en kg/cm^2. El pH del homogenato se midió con pH-chímetro (Altronix). Los sólidos soluble totales se determinaron en el jugo con un refractómetro de mano N1 Atago (Osaka, Japan) y los valores se expresaron en grados Brix. La acidez titulable se determinó por titulación de una muestra, de 10 g de homogenato en 100 ml de agua destilada, con NaOH 0.2 N utilizando como indicador fenoftaleína (pH 8.2). A partir de los parámetros SST y AT se calculó el ratio.

Preparación de los extractos

Se extrajo 100 g de un homogenato obtenido a partir de 10 frutos enteros (pulpa y piel, sin carozo), con 200 ml of etanol (96º) conteniendo ácido cítrico 0.20% p/p. Este procedimiento se realizó por duplicado obteniéndose dos extractos por variedad de ciruela. Los extractos se filtraron al vacío y almacenaron a -20ºC.

Ensayo del radical DPPH ●+

La capacidad antioxidante (CA) se determinó mediante el método del DPPH, el cual se basa en la utilización del radical libre 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazylo (Brand-Williams et al. 1995). Un total de 25 µl de extracto de ciruelas rojas y 50 µl de extracto de ciruelas amarillas se llevaron a 1 ml con etanol, (96º). Las muestras

diluidas reaccionaron con 2 ml of DPPH●+ (150 µM en metanol). La disminución de la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Modelo Lambda 25) a 517 nm luego de 30 minutos de reacción. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox/ 100g de peso fresco (µmol ET/100 g PF).

Contenido de Fenoles

Los fenoles (CF) se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu (Swain y Hillis 1959), utilizando una curva patrón de ácido gálico. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco (mg EAG/ 100 g PF). Las muestras (50 µl de extracto) o el estándar (100, 200, 300, 400, 500, 800, 900 µl de 0.074 µg/µl ácido gálico) se diluyeron con agua y se le adicionaron 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N). Se dejó reaccionar 3 minutos y se adicionaron 500 µl de carbonato de sodio 0.1N. Los resultados fueron leídos a 725 nm luego de 1 hora.

Antocianinas

El contenido de antocianinas se determinó de acuerdo al método del pH diferencial (AOAC) (Lee et al. 2005), basado en el cambio de absortividad molar que ocurre al enfrentar a una solución de antocianinas a dos tampones diferentes. A 1 ml de extracto etanólico filtrado, se le adicionaron 4 ml de agua desionizada (solución A). Se diluye 1 ml de la solución A con 4 ml de la solución del buffer pH 1.0 (cloruro de potasio 0.025 M). Por otro lado, se diluye 1 ml de la solución A con 4 ml de la solución buffer pH 4.5 (acetato de sodio 0.4 M). Se leen las absorbancias de ambas soluciones en espectrofotómetro a 520 y 700 nm, luego de un período de 20-50 minutos.

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de variancia (ANOVA) y al test de Tuckey para identificar diferencias entre medias, utilizando el programa InfoStat versión 2013.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso promedio del fruto para los cuatro cultivares de ciruelo analizados se muestra en la **Tabla1**. Los mayores pesos fueron para Ruby Sweet y Byron Gold. La firmeza de este último difirió significativamente del resto. Los frutos de piel amarilla presentaron mayor luminosidad (L*) y valores de b*, mientras que los frutos de piel roja mayores valores de a* (**Tabla 1**). El color es el indicador más importante de calidad y madurez en muchas especies frutales (Drake et al. 1982). El color de la piel y la firmeza se utilizan para determinar el momento de cosecha ya que ambos parámetros son índices del estado de madurez. El color podría estar correlacionado con el contenido de compuestos fenólicos (Vasantha Rupasinghe et al. 2006), encontrándose influenciado por la concentración y distribución de las antocianinas en la piel (Gao y Mazza 1995). En este trabajo se halló que el valor de a* (piel) para Casita de chocolate y Ruby Sweet no difirió significativamente. No hubo diferencias significativas en los SST entre las 4 variedades analizadas, obteniéndose un promedio de 15.6 ºBrix. La variedad más ácida fue Casita de chocolate (pH de 3.08). La concentración de ácidos orgánicos y azúcares posee un impacto importante sobre el flavor y la calidad de los frutos e influyen en la textura y conservación de los productos elaborados en base a ellos, como por ejemplo mermeladas.

Tabla 1. Parámetros de calidad a cosecha, peso del fruto (P), firmeza (F), color de la piel (L*, a*, b* y C*), pH, sólidos solubles totales (SST) y ratio, de las variedades de ciruelo utilizadas en el ensayo. Los valores representan la media de 15 repeticiones

Cultivar	P (g)	F (kg/cm2)	L*	a*	b*	C*	pH	SST (º Brix)	Ratio SST/AT
CC	33.73 b	53.90 b	29.55 d	12.00 a	3.81 c	12.60 c	3.08 c	15.14 a	6.75 c
RS	78.46 a	46.95 c	35.85 c	14.09 a	10.52 b	17.67 b	3.41 a	15.54 a	12.48 a
BPA	43.30 b	57.10 b	50.57 b	0.33 b	33.51 a	33.57 a	3.31 ab	15.52 a	10.79 b
BG	84.73 a	74.03 a	58.09 a	1.57 b	35.38 a	36.14 a	3.24 b	16.24 a	13.13 a

Letras diferentes dentro de una misma columna indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre las variedades.

El contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos acidificados de las cuatro variedades analizadas, medido por el método de Folin-Ciocalteu, estuvo en el rango de 85.6-245.96 mg EAG/ 100 g PF (Tabla 2), siendo significativamente superior para Ruby Sweet. Los mayores valores se hallaron en los frutos de piel y pulpa roja. Estos resultados concuerdan con los hallados por Valero et al. (2012). Vasantha Rupasinghe et al. (2006) informan un valor de 198 mg EAG/ 100 g PF para una selección de ciruelo japonés, mientras que Kim et al. (2003) hallaron un rango de valores, para seis cultivares, de 174-375 mg EAG/100 g PF. La capacidad antioxidante, medida por el método del radical DPPH, expresado como µmol ET/100 g PF se muestra en la **Tabla 2**. Entre las diferentes especies de *Prunus* las variedades de ciruelos rojos o negros son los que poseen mayor capacidad antioxidante (Fanning 2004). Las variedades de ciruelas sanguíneas analizadas mostraron una CA entre 2-3 veces superior a las variedades de piel amarilla. La mayor capacidad antioxidante la presento Ruby Sweet, 1269.78 µmol ET/100 g de PF. Los compuestos fenólicos predominantes en ciruelos son los derivados del ácido hidroxicinámico, como el ácido clorogénico y neoclorogénico. Los glicósidos de quercetina quercetin pentosil-hexosido, quercetin-3-glucosido, quercetin-3-rutinosido, quercetin pentosil-pentosido, quercetin-3-xilosido, quercetin-3- arabinosido, quercetin acetil-hexosido y quercetin-3-ramnosido, han sido identificados en ciruelos japoneses. Estos podrían ser responsables de la capacidad antioxidante de las variedades analizadas. Casita de chocolate superó a Ruby Sweet en el contenido de antocianinas, presentando un valor de 9.3 mg eq.cianidin 3-glucósido/g PF, el cual supera el rango encontrado en la bibliografía de 0.54 a 2.74 mg/g PF (Fanning 2014). Estas diferencias con los datos bibliográficos podrían deberse al genotipo y al grado de madurez de los frutos analizados. Byrne et al. (2007) observaron que el contenido de antocianinas de variedades rojas de ciruela, se incrementaba sustancialmente durante 4 días de maduración a temperatura ambiente, mientras la firmeza decrecía, indicando que el fruto continúa sintetizando antocianinas durante la maduración hasta el período de senescencia.

La mayoría de los compuestos fenólicos, particularmente las antocianinas, están concentradas en la piel de los frutos (Tomas-Barberán 2001), pero en las variedades sanguíneas, la pulpa también podría contribuir a los valores hallados. Estas variedades de ciruela contienen mayor cantidad de antocianinas en la pulpa en relación a otros frutos como berries y uvas. Las principales antocianinas en los ciruelos japoneses son cianidin-3-glucosido and cianidin-3-rutinosido, pero otros derivados de cianidina, cianidin 3-(6″-acetoyl) glucosido, cianidin 3-(6″-malonyl) glucosido and cianidin-3-galactosido y derivados de peonidina han sido identificados. Fanning et al. (2014) consideran a las antocianinas de las variedades sanguíneas como una importante fuente de antocianas dietarias. Estas variedades suelen procesarse como fruto entero enlatado o se utilizan en la elaboración de mermeladas. Aunque el calentamiento puede resaltar el atractivo color rojo otorgado al producto por las antocianinas se produce una pérdida de hasta el 70% de las mismas, mientras la mayoría del contenido de compuestos fenólicos se preserva (Kim y Padilla-Zakour. 2004). Los antioxidantes son necesarios para prevenir las reacciones degenerativas producidas por las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno in vivo y la peroxidación lipídica en alimentos (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos. 2003). Los compuestos fenólicos presentes en los tejidos de los frutos de ciruela podrían contribuir con estos objetivos.

Tabla 2. Capacidad antioxidante (CA), contenido de fenoles totales (CF) y antocianinas (A) de fruto entero de las variedades de ciruelo utilizadas en el ensayo. Los resultados son promedio de 10 frutos y se encuentran expresados en base fresca

Cultivar	CA (µmol ET/100g)	CF (mg EAG/100 g)	A (mg eq.Cianidin 3-glucósido/g)
CC	869.70 b	144.22 b	9.30 a
RS	1269.78 a	245.96 a	4.17 b

BPA	531.64 c	117.58 c	-
BG	401.81 d	85.60 d	-

Letras diferentes dentro de una misma columna indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre las variedades.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron una significativa influencia del cultivar sobre el peso del fruto, la firmeza, el color, el ratio, la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles y de antocianinas, observándose una diversidad en los tres últimos parámetros mencionados. Debido a que los cuatro cultivares analizados pertenecen a lotes implantados dentro de una misma superficie, conducida en forma similar, la variabilidad encontrada podría atribuirse al genotipo. Las variedades de ciruelas sanguíneas se destacaron por su elevada actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos (antocianinas), lo cual las posiciona como materia prima interesante para ser utilizadas como colorantes naturales o fuente de sustancias bioactivas, para aditivar diferentes matrices alimenticias. El contenido de fenólicos, relacionado con la astringencia es un factor a considerar según el destino de la fruta.

La presencia de sustancias bioactivas en la ciruela abre interesantes perspectivas para su aprovechamiento ya sea vía tecnologías simples de aislamiento y purificación, así como también para la preservación de esas sustancias, beneficiosas para la salud, en los alimentos que las contienen. Actualmente el grupo de trabajo se encuentra evaluando técnicas de protección y conservación de los bioactivos de ciruela en el producto alimenticio final. Ello brindará seguramente mejores propiedades saludables. Del análisis de la variación del contenido de compuestos fenólicos y antocianinas durante el desarrollo el fruto y/o la conservación, podremos conocer el contenido óptimo de la materia prima con el fin de preservarlo luego de la elaboración del producto.

BIBLIOGRAFÍA

Blazek J. 2007. A survey of the genetic resources used in plum breeding. Acta Horticulturae, 734: 31-45.

Brand-Williams W, Cuvelier, ME, Berset C.1995.Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science Technology, 28:25-30.

Byrne D, Cisneros L, Ramming W, Ramming D. 2007. Health benefits of peaches and plums. California Tree Fruit Agreement. Annual Research Report, 50-69.

Cevallos-Casals B.A, Cisneros-Zevallos L. 2003. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3313–3319.

Crisosto CH, Garner D, Crisosto GM, Bowerman E. 2004. Increasing ´Blackamber´plum (*Prunus salicina* Lindell) consumer acceptance. Postharvest Biology and Technology, 34: 237-244.

Drake SR, Proebsting EI Jr, Spayd SE. 1982. Maturity index for the color grade of canned dark sweet cherries. Journal of the American Society of Horticultural Science, 107: 180-183.

Fanning KJ, Topp B, Russell D, Stanleyd R, Netzel N. 2014. Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.) and phytochemicals – breeding, horticultural practice, postharvest storage, processing and bioactivity. Journal of the Science and Agriculture, 94: 2137–2147.

Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, Li HB. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. Food Chemistry, 129: 345-350.

Gao L, Mazza G. 1995. Characterization, quantitation and distribution of anthocyanins and colourless phenolics in sweet cherries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 343-345.

Kim DO, Jeong SW, Lee CY. 2003. Antioxidants capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry, 81: 321-326.

Kim DO, Padilla-Zakour OI. 2004. Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin-rich fruits: cherry, plum, and raspberry. Journal of Food Science, 69:S395–S400.

Lee J. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC International, 88: 1269-1278.
Li Y, Lai P, Chen J, Shen H, Tang B, Wu L, Weng M. 2016. Extraction optimatization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina* Lindl, Food Science and Technology, 36. On-line versión ISSN 1678-457x
Stacewicz- Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR. 2001. Chemical Composition and Potential Health Effects of Prunes: A Functional Food? Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 41: 251-286.
Swain T, Hillis W E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture, 10:63-68.
Tomás-Barberán F A, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B, Kader AA. 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4748-4760.
Valero Y, Colina J, Ineichen E. 2012. Efecto del procesamiento sobre la capacidad antioxidante de la ciruela criolla (*Prunus domestica*). Arhivos Latinoamericanos de Nutrición, 62: 363-369.
Vasantha Rupasinghe HP, Jayasankar S, Lay W. 2006. Variation in total and antioxidant capacity among European plum genotypes. Scientia Horticulturae, 108: 243-246.

AGRADECIMIENTOS
Se agradece los aportes realizados por el Proyecto Específico No. 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” (PNAIyAV-INTA), para realización del presente trabajo.

Evaluación microbiológica de jamón cocido de pavo listo para consumo

De Vasconcelos A.M.(1), Silva P.L.(1), Santos N.L.(1), Monte A.L.S.(1), Santos S.M.L.(1), Damaceno M.N.(1)

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - *Campus* Limoeiro do Norte, Rua Estevão Remígio, n. 1145, 62930-000, Limoeiro do Norte, Ceará, Brasil.
marleneifce@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad microbiológica del jamón de pavo cocido comercializado en fetas (tajadas) en dos ciudades en el nordeste de Brasil. Los análisis microbiológicos fueron realizados siguiendo los criterios establecidos por el reglamento técnico en estándares microbiológicos para alimentos de la Agencia Nacional de Vigilancia de la Salud de este país. Se realizaron análisis de coliformes totales (máximo 1.0 x 10^3 NMP.g^{-1}), *Staphylococcus aureus* (máximo 3.0 x 10^3 UFC.g^{-1}), *Clostridium* Sulfito-reductores a 46 °C (máximo 5.0 x 10^2 UFC.g^{-1}), *Salmonella* sp. en 25 g (ausencia), levaduras y mohos (UFC.g^{-1}), además de los análisis de la acidez titulable, pH y actividad de agua. Los resultados mostraron negatividad para la prueba de coagulasa y para la presencia de *Salmonella* en todas las muestras. Los coliformes totales estuvieron presentes indicando la manipulación y/o almacenamiento inadecuado del producto y todas las muestras evaluadas presentaron contaminación por mohos y levaduras, con valores que van desde 7.3 x 10^4 a 1.17 x 10^8 UFC.g^{-1}. Con eso se concluye que las muestras de jamón cocido de pavo en lonchas eran inadecuadas para el consumo en el estado analizado.

Palabras Clave: Contaminación, Manipulación, Alimento en lonchas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of cooked turkey ham marketed in slices (slices) in two towns in northeast Brazil. Microbiological analyzes were performed according to the criteria established by the technical regulation on microbiological standards for foods of the National Agency for Health Surveillance in this country. The samples were subjected to analysis of fecal coliforms (maximum 1.0 x 10^3CFU.g^{-1}), *Staphylococcus aureus* (maximum 3.0 x 10^3CFU.g^{-1}), *Clostridium* sulphite-reducing to 46 °C (maximum 5.0 x 10^2 CFU.g^{-1}), *Salmonella* sp. 25 g (absence), yeasts and molds (CFU.g^{-1}) in addition to the analysis of the titratable acidity, pH and water activity. The results showed negative for coagulase test for the presence of *Salmonella* in all samples. Total coliforms were present indicating the handling and / or improper storage of the product and all tested samples showed contamination by molds and yeasts, with values ranging from 7.3 x 10^4 to 1.17 x 10^8 CFU.g^{-1}. That is concluded the samples of cooked ham sliced turkey were inadequate for consumption in the analyzed state.

Keyword: Contamination, Handling, Food sliced.

INTRODUCCIÓN

El jamón cocido es consumido en todo el mundo debido a su jugosidad, sabor, aroma y practicidad, siendo una buena alternativa para almuerzos o comidas que requieren una preparación rápida. Es un alimento con alta actividad de agua y se utiliza cortado en tajadas, éstas cuando se manipulan o almacenan incorrectamente puede alterar su calidad higiénica sanitaria debido a la carga microbiana patógena que crece con facilidad en estas condiciones, requiriendo una vigilancia constante de tales productos por los órganos de control en cada país.

El jamón, en todas sus variantes, como el pavo, es ampliamente consumido y disfrutado por la población mundial debido a las características naturales tales como el sabor y el aroma impactante, que cuenta con el

título de primer producto de la industria de la carne cuya demanda ha aumentado considerablemente (Bressan et al., 2007). Las malas condiciones en la preparación, fraccionamiento y almacenamiento, puede hacer que sea un alimento vehículo de microorganismos patógenos (Fachinello y Casaril, 2013).

En Brasil, el jamón puede presentarse con diferentes composiciones químicas debido a la heterogeneidad de las formas de preparación. Se observa que las principales características químicas con las que debe cumplir este producto para mantener la calidad, en general, tienen un pH entre 5.9 y 6.1, la actividad de agua de 0.91 a la 0.97 (Brasil, 2000) y un humedad que oscila entre las 74.06 y 75.85 (Pedroso y Demiate, 2008).

La manipulación inadecuada, la falta de garantía de la seguridad alimentaria y la información insuficiente sobre la importancia de la seguridad alimentaria, conducen a la aparición de numerosos casos de infecciones e intoxicaciones (Freo y Reolon, 2006). El fraccionamiento del jamón produce una mayor exposición al oxígeno debido al aumento de la superficie expuesta, haciendo que sea más susceptible de multiplicación de bacterias aeróbicas, con una mayor probabilidad de producir gastroenteritis en personas que lo consuman.

La mala limpieza de los equipos y la mala higiene de las manos de los manipuladores de alimentos, así como la no utilización de gorras, las conversaciones durante la manipulación, puede representar una fuente importante de microorganismos causantes de deterioro o patógenos, lo que representa un riesgo para la salud de los consumidores (Serio et al., 2009).

Estos microorganismos viables o no viables se depositan en la superficie del jamón, utilizándolo como alimento y formando una especie de "cubierta" llamada biopelículas (Chmielewski y Frank, 2003). Para su formación existe la necesidad de contacto con el microorganismo, la consiguiente colonización con la producción de sustancias poliméricas y finalizar la maduración de estos. Superficies mal desinfectadas terminan sirviendo al contacto inicial de la adhesión microbiana (Oliveira et al, 2006).

La contaminación del jamón con microorganismos patógenos puede afectar la textura del producto debido a la producción de enzimas proteolíticas, y además afectar de esta manera el período de validez del producto (Larrea, et al., 2007).

Los posibles riesgos de contaminación de alimentos, demuestran la necesidad de evaluar las condiciones sanitarias de estos establecimientos (OLIVEIRA et al., 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se recogieron cuatro muestras de jamón de pavo de la misma marca, comercializadas en dos ciudades de la región del Baixo Jaguaribe en el estado de Ceará, las cuales fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio de Bromatología y Microbiología de los Alimentos IFCE *Campus* Limoeiro do Norte-CE para su análisis.

Preparación de la muestra

La muestra de jamón de pavo de cada establecimiento fue fraccionada asépticamente en un flujo laminar (Slee Mainz® Mainz-Alemania) con cuchillo y tenedor previamente flameado y 10 g de jamón pesados en balanza semi-analítica (Marte Científica® Modelo BL3200H Sao Paulo-Brasil), se colocaron en matraz conteniendo 90 mL de solución salina estéril. A partir de esta solución se realizaron diluciones posteriores (10^{-1} a 10^{-5}).

Análisis microbiológicos

De acuerdo con la RDC Nº 12 del 2 de enero de 2001, de la Agencia Nacional de Vigilancia de la Salud, se requiere para llevar a cabo el recuento de coliformes a 45°C (máx 1 x 10^3 NMP. g^{-1}), *Staphylococcus* coagulasa positiva (máximo 3.0 x 10^3 UFC.g^{-1}), *Clostridium* sulfito-reductores de 46°C (máximo 5.0 x 10^2 UFC.g^{-1}) y *Salmonella* en 25 g (ausencia).

De acuerdo con la metodología de APHA (1995) se llevó a cabo para determinar el número más probable (NMP) de coliformes fecales utilizando nueve tubos de ensayo que contienen 10 mL de medio de cultivo DifcoTM A-1 simple media cada una. Se inoculó 1 mL en cada tubo y luego se trasladó al horno (Heraeus Thermo Electron Corp. Incubadora, modelo UT 6 Hanau-Alemania) a 35°C durante 3 horas y, posteriormente, en un baño de agua a 45°C durante 21 h.

Para mohos y levaduras se hizo mediante la inoculación de 0.1 mL de las diluciones preparadas 10^{-1} a 10^{-5}en

placas de Petri que contienen el medio Agar KASVI® de dextrosa de patata (BDA) pronto rendimiento después del proceso de dispersión de la muestra con manija Drigalsky (Siqueira, 1995). Después de este procedimiento, las placas se incubaron a 28°C por 48 horas. Después del período de incubación, se llevó a cabo el recuento de las placas.

Para la detección de *Staphylococcus aureus* se inocularon 0.1 mL de las diluciones preparadas en placas de Petri que contienen el medio de cultivo agar Baird Parker KASVI®, emulsión yema de huevo y telurito de potasio a 1%, que se incubaron a 35°C por 48 h (SIQUEIRA, 1995). A continuación, se procedió el recuento Presuntivo del número de colonias que tenían características típicas de *S. aureus*. De estos, se seleccionaron 5 colonias de cada placa y se incubaron en tubos con 5 mL de caldo infusión cerebro corazón KASVI® a 35°C durante 24 horas de forma individual y 0.2 mL de cada tubo de ensayo fueron sometidos a las pruebas catalasa para la confirmación de la cuenta de *S. aureus* (Silva, Junqueira y Silveira, 2001). Para la detección de *Salmonella* sp. se llevó a cabo inicialmente un pre-enriquecimiento, en el cual se coloca 25 g de la muestra en 225 mL de caldo de lactosa estéril, y se incubó a 35°C durante 24 horas. Para el enriquecimiento selectivo se transfirió 1.0 mL de esta solución a 10 mL de caldo Rapparport-Vassiliadis (KASVI®) previamente esterilizado y se incubaron a 35°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó el revestimiento diferencial, un movimiento vertical estriando placas de agar entérico de Hactoen (KASVI®) y agar Verde Brillante (KASVI®) e incubación a 35°C durante 24 horas. Las colonias típicas, re-aislados en tubos inclinados de agar de hierro lisina (KASVI®) y agar hierro triple azúcar (KASVI®) se incubaron a 35°C durante 24 horas. Los microorganismos aislados se sometieron a la identificación bioquímica con la prueba de indol (Silva, Junqueira y Silveira, 2001).

Análisis fisicoquímicos

Para la determinación de la acidez valorable, se pesaron 5.0 g de muestra en balanza analítica (modelo Bel Ingeniería M154Ai Piracicaba, Brasil) y se llevaron a 50 mL con agua destilada. Se tituló la muestra con solución de NaOH 0.1 N y los resultados se expresaron en porcentaje (%) de ácido láctico. El potencial de hidrógeno (pH) se determinó en 1.0 g de pulpa diluida en 10 mL de agua destilada a través del modelo potenciómetro digital (Hanna HI 9321 Instruments® Barueri- Brasil) calibrado con soluciones tampón de pH 4.0 y 7.0, de acuerdo con la metodología recomendada por el Instituto Adolfo Lutz (2008).

En la determinación de la actividad de agua se utilizó dispositivo Decagon Aqualab Lite® São José dos Campos - Brasil. Preparación de la muestra y el uso del instrumento se llevaron a cabo como se describe en el manual de instrucciones de funcionamiento. Análisis de humedad se realizó mediante secado directo de la muestra por calentamiento a 105°C durante 3 horas en horno para secar, se enfrió en desecador durante media hora y se pesó las muestras hasta peso constante de acuerdo con la metodología del Instituto Adolfo Lutz (2008).

Diseño y análisis experimental

El diseño era DIC (diseño completamente al azar). Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) para probar la diferencia entre los resultados. Para la comparación de medias se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$) a través del programa estadístico Statistica para Windows versión 7.0 (STATSOFT, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se observa que de las cuatro muestras evaluadas, dos estuvieron contaminadas por coliformes fecales, mostrando la muestra D valores por encima del límite establecido. Las muestras restantes están en conformidad con la legislación, tanto para este microorganismo como para *S. aureus* y *Salmonella*. (Brasil 2001).

Los resultados de este estudio fueron más altos que los encontrados por Menezes et al. (2010) quienes analizaron 10 muestras de jamón en fetas en la ciudad de São Luís el 30% de las cuales presentaron contaminación por coliformes fecales. La presencia de coliformes fecales indica que las condiciones sanitarias en estos establecimientos son insuficientes y pueden estar asociados con la contaminación cruzada por la máquina de corte, los utensilios o la falta de prácticas higiénicas apropiadas por los manipuladores

durante las etapas de corte en fetas y envasado del producto.

Tabla 1. Caracterización microbiológica de jamón de pavo en fetas refrigerado.

Muestras	Coliformes fecales NMP.g-¹*	Levaduras y Mohos UFC.g-¹**	Prueba de coagulasa (+/-)***	*Salmonella sp* (25g) (P/A)****
A	<3	7.3×10^4	-	Ausente
B	<3	2.0×10^7	-	Ausente
C	210	3.0×10^7	-	Ausente
D	>2400	1.2×10^8	-	Ausente

*NMP-Número Más Probable; **Unidad Formadora de Colonia; ***Confirmatoria/Negativo; ****Presencia/Ausencia.

Todas las muestras analizadas presentaron contaminación por mohos y levaduras, con valores que van desde 7.3×10^4 a 1.2×10^8 UFC/g^{-1}. Estos microorganismos no se encuentran naturalmente en los productos cárnicos, por lo tanto su presencia puede deberse a contaminación cruzada, la temperatura de almacenamiento inadecuada o mala higiene de los manipuladores de alimentos. Resultados similares fueron encontrados por Serio et al. (2009) y Menezes et al. (2010) quienes también encontraron la presencia de mohos y levaduras en todas las muestras.

Si bien no se detectó la presencia de *S. aureus* en las muestras, estas si presentaron alta contaminación por *Staphylococcus* sp. (coagulasa negativo). Los resultados de este estudio fueron similares a los encontrados por Fachinello y Casaril (2013), al analizar 14 muestras de jamones en fetas, 13 estaban contaminados, todos coagulasa negativo. Si bien las enterotoxinas se producen principalmente por estafilococos coagulasa positivo, algunos estafilococos coagulasa-negativo se encuentran involucrados en una variedad de infecciones en los seres humanos. Cunha et al. (2006) estudiaron 88 muestras de alimentos y observaron la presencia de los genes para la producción de enterotoxina en algunas cepas de estafilococos coagulasa-negativos, por lo tanto, la presencia de *Staphylococcus* sp. establece un riesgo de intoxicación alimentaria.

Es de destacar que estos microorganismos pueden encontrarse en la piel, membranas mucosas, tracto respiratorio superior y en el intestino humano por lo tanto las condiciones higiénicas insatisfactorias de máquinas de cortar son las principales fuentes de contaminación de los jamones por este patógeno (Fachinello y Casaril, 2013).

Los resultados para el análisis de humedad, actividad del agua (Aw), pH y la acidez se describen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Análisis fisicoquímico de jamón de pavo en fetas refrigerado.

Muestras	Humedad (%)	Aw*	pH	Acidez Valorable (Ácido láctico g.100g^{-1})
A	23.11 ± 0.121	0.76 ± 0.001	6.77 ± 0.075	6.82 ± 0.538
B	23.60 ± 0.103	0.76 ± 0.003	6.75 ± 0.005	6.84 ± 0.575
C	24.11 ± 0.073	0.75 ± 0.015	6.59 ± 0.065	5.94 ± 0.743
D	23.16 ± 0.320	0.74 ± 0.008	6.65 ± 0.072	5.47 ± 0.268

* Actividad de agua. Las medias seguidas por la desviación estándar.

El contenido de humedad de las muestras varió de 23.11 a 24.11%, el Reglamento Técnico y de Normas y Calidad (Brasil, 2000) define un máximo de 75% de humedad, por tanto, los valores encontrados en este estudio son consistentes con la legislación vigente.

Para el parámetro de actividad de agua (Aw) los valores van de 0.74 a 0.76. Estos valores de actividad de agua indica que la mayor parte del agua es libre, que es capaz de se utiliza en las reacciones químicas, enzimáticas y el desarrollo de microorganismos. La legislación brasileña no informa límites para este parámetro pero es una variable importante porque influencia la velocidad de crecimiento microbiano, así cuanto mayor sea el valor de este parámetro, más susceptible es de presentar la proliferación de microorganismos.

La variación del pH fue entre 6.59 y 6.77, caracterizando como alimento de baja acidez. Resultados similares (6.34 a 6.43) fueron encontrados por Januzzi (2007) al evaluar muestras de jamón cocido.
En cuanto el parámetro acidez titulable se observa variación entre 5.47 y 6.84 estos valores que es superior a los obtenidos por Januzzi (2007) encontraron resultados en el rango de 0.23 a 0.25. Esta diferencia puede estar relacionada a factores como la materia prima utilizada y carga microbiana inicial. La legislación Brasileña no informa límites para este parámetro.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados, todas las muestras han sido declaradas no aptas para el consumo por la presencia de levaduras, mohos y coliformes fecales.
Esto demuestra que hay una necesidad de una mayor supervisión por las autoridades sanitarias de fiscalización, dado que tanto la manipulación y el almacenamiento adecuado de los productos fraccionados son muy importantes para el mantenimiento de la salud de los consumidores de dichos productos. Tales medidas pueden ser cruciales en el mantenimiento de la salud de estos consumidores, dado el peligro potencial de infecciones e intoxicaciones por la ingestión de este producto cuando pobremente preparados y / o manipulado.

BIBLIOGRAFÍA

APHA. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works association, Water Environment Federation, Washington, 1995.
BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 20 de 31de julho de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de almôndega de apresuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2000. Seção 1, p. 7-12.
BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de janeiro de 2001.
Bressan MC, Lodi F, Ferreira MW, Andrade PL, Boari CA, Piccoli, RH. Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. Ciência e Agrotecnologia, v. 31, n. 2, p. 433-438, 2007.
Cunha MDLRD, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. Brazilian Journal of Microbiology, v. 37, n. 1, p. 70-74, 2006.
Fachinello JP, Casaril KBPB. Avaliação da qualidade microbiológica de presuntos fatiados, comercializados no município de Francisco Beltrão, Paraná. Alimentos e Nutrição, v. 24, n. 3, p. 333-337, 2013.
Freo JD, Reolon J. Qualidade dos produtos derivados de carne e leite, industrializados pelas agroindústrias de Frederico Westphalen, RS. Higiene Alimentar, v. 21, n. 140, p. 53-59, 2006.
Lutz, I. A. Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v. 4, 2008.
Januzzi, AGVA. Características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de produto tipo presunto cozido desenvolvido com adição de fibras solúveis e insolúveis. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
Larrea V, Pérez-Munuera I, Hernando I, Quiles A, Llorca E, Lluch MA. Microstructural changes in Teruel dry-cured ham during processing. Meat Science, v. 76, n. 3, p. 574-582, 2007.
Menezes PMS, Coelho LM, Costa FN. Avaliação microbiológica e microscópica de presuntos fatiados refrigerados. Alimentos e Nutrição, v. 20, n. 1, p. 135-139, 2009.
Menezes PMS, Coelho LM, Costa FN. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos presuntos fatiados comercializados na cidade de São Luís, MA. Biológico, v. 72, n. 1, p. 11-17, 2010.
Oliveira LATD, Franco RM, Carvalho JCADP, Almeida Filho ESD, Gonçalves PMR. Biofilme na indústria

de alimentos: revisão. Higiene Alimentar, v. 20, n. 141, p. 33-35, 2006.
Oliveira SPD, Freitas FV, Muniz LB, Prazeres R. Condições higiênico-sanitárias do comércio de alimentos do município de Ouro Preto, MG. Higiene Alimentar, v. 19, n. 136, p. 26-31, 2005.
Pedroso RA, Demiate IM. Avaliação da influência de amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 1, p. 24-31, 2008.
Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 2001.
Siqueira RS. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: Embrapa, 1995.
STATSOFT. Statistica. 7.0 software. Tucksa, USA, 2004.

AGRADECIMIENTOS
Ao IFCE- *Campus* Limoeiro do Norte-CE; CAPES e FUNCAP.

Estudio del contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de algas marinas de la Patagonia argentina

Delcarlo, S.B. [1,2]; Schelegueda, L.I. [1,2]; Dellatorre, F.G. [2,3]; Campos, C.A. [1,2]

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias, Buenos Aires, Argentina.
(2) CONICET, Buenos Aires, Argentina.
(3) Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Chubut, Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Pesca (GIDTAP), Puerto Madryn, Argentina

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de algunas especies de macroalgas marinas, así como el efecto del solvente usado en la extracción. Las algas se recolectaron en la costa de Puerto Madryn y se identificaron como *Ulva spp.*, *Codium decorticatum*, *Dictyota dichotoma* y *Undaria pinnatifida*. Luego, se liofilizaron y molieron. Como solvente de extracción se utilizó etanol y una mezcla etanol:agua 80:20. El contenido de polifenoles se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, mientras que la actividad antioxidante se cuantificó a través de la capacidad de reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH). Los datos se analizaron aplicando un ANOVA seguido por el test de Tukey. Con respecto al contenido de polifenoles, la extracción con la mezcla etanol:agua fue más efectiva para *Ulva spp.*, *C. decorticatum*, y *U. pinnatifida*; mientras que para *D. dichotoma* la extracción con etanol resultó más efectiva. Al evaluar la capacidad antioxidante, los mejores resultados se obtuvieron para los extractos con etanol de *C. decorticatum* y *D. dichotoma*, y para el extracto con etanol:agua de *Ulva spp.* Los extractos estudiados presentan potencial para su uso en la preservación de alimentos.

Palabras clave: algas, antioxidantes, polifenoles

ABSTRACT

In the present study, the total polyphenol content and the antioxidant capacity of algae as well as the effect of the solvent used for the extraction was studied. The algae were gathered from the coast of Puerto Madryn and identified as *Ulva spp.*, *Codium decorticatum*, *Dictyota dichotoma* and *Undaria pinnatifida.* Afterwards they were lyophilized and grinded. As extraction solvents ethanol and an 80:20 mixture of ethanol and water were used. The total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method, while the antioxidant activity was quantified through the capacity to reduce the radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH). The data were analyzed applying an ANOVA followed by the Tukey test. Regarding the total polyphenol content, the extraction with the ethanol:water mixture was more effective for *Ulva spp.*, *C. decorticatum*, and *U. pinnatifida*, whereas the ethanol extraction was more effective for *D. dichotoma*. In assessing the antioxidant capacity, the best results were obtained for the ethanol extracts of *C. decorticatum* and *D. dichotoma*, and the ethanol: water extract of *Ulva spp.* The studied extracts show potential for further use in food preservation.

Key words: algae, antioxidants, polyphenols

INTRODUCCIÓN

Las algas son conocidas por su uso en países orientales como Japón, China y Corea como parte de la dieta habitual (Ismail y Siew 2002). En el último tiempo su consumo ha sido incorporado en Occidente. Una de las razones de esta incorporación es su elevado contenido de compuestos con actividad biológica. Las algas son de interés nutricional dado que son alimentos bajos en calorías, pero ricos en vitaminas, minerales, proteínas,

polisacáridos, fibra dietaria y compuestos bioactivos (Adaikalaraj et al. 2012). Entre los últimos se destacan los antimicrobianos, anti-inflamatorios, anti-carcinogénicos y antioxidantes. Aunque existen numerosas publicaciones sobre sus propiedades y componentes, su potencial aún no ha sido completamente desarrollado y, en particular, la información sobre las algas que se encuentran en el mar argentino es escasa.

Los compuestos con capacidad antioxidante, son importantes para los organismos vivos ya que facilitan el control del nivel de radicales libres a nivel celular (Machu et al. 2015). Aunque los compuestos antioxidantes de origen sintético tales como el butilhidroxianisol (BHA) o el butilhidroxi tolueno (BHT) son y han sido utilizados para extender la vida útil de cosméticos y alimentos, actualmente los consumidores plantean una fuerte demanda de compuestos de origen natural. En este contexto, las algas resultan un recurso de interés ya que son capaces de producir metabolitos secundarios que las protegen del stress oxidativo al que están expuestas por las condiciones en que se desarrollan -luz y altas concentraciones de oxígeno- (Alves Pinto 2012, Balboaa et al. 2013).

Entre los compuestos con capacidad antioxidante pueden mencionarse los polifenoles. Estos son un gran grupo de compuestos que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos e incluyen entre otros a fenoles, cumarinas, flavonoides y taninos. Debido a su estructura química, en general, presentan actividad antioxidante y son necesarios para el funcionamiento de las células vegetales (Parsaeimehr y Lutzu 2016*)*. Existen numerosos estudios sobre compuestos fenólicos que no están presentes en plantas terrestres, pero sí en varios tipos de algas, como por ejemplo los florotaninos, los cuales presentan alta capacidad antioxidante (Koivikko 2008). Por otra parte, resulta esencial la selección del solvente adecuado con el fin de obtener resultados reproducibles en cuanto a la extracción de compuestos bioactivos.

Entre los posibles usos de extractos de algas, se ha demostrado que la adición de dos algas marrones, *Ecklonia radiata*, y *Macrocystispyrifera* y dos algas rojas, *Champiasp.* y *Porphyra sp*. permitió reducir la oxidación lipídica en aceite de pescado con una efectividad comparable a la del BHT (Kindleysides et al. 2012). Además, la adición de un extracto etanólico de *Fucus spiralis* al hielo en escamas redujo el deterioro lipídico y el crecimiento microbiano en pez gallo, extendiendo su vida útil (Miranda et al. 2016).

En base a lo comentado y con el objetivo futuro de utilizar biomoléculas provenientes de algas en la preservación de alimentos, la finalidad del presente trabajo fue estudiar la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles de algas provenientes de la costa patagónica argentina, así como el efecto del solvente utilizado en la extracción de las biomoléculas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención e identificación de las algas

Las algas se recolectaron en la costa de Puerto Madryn en julio de 2015 y se identificaron como *Ulva spp*., *Codium decorticatum*, *Dictyota dichotoma* y *Undaria pinnificada* en el Laboratorio del Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Pesca (GIDTAP) de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Chubut. Se lavaron con agua y se colocaron en bolsas de polietileno que se mantuvieron refrigeradas para evitar la descomposición de las algas y la pérdida de metabolitos secundarios hasta el momento en que se procedió a su liofilización.

Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos, las algas congeladas se deshidrataron durante 24 horas en un liofilizador (MartinChrist, Alpha 1-4 LD, Dinamarca). Luego, se trituraron con un molinillo hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 0,5 gramos de cada muestra de alga, por duplicado, y se realizaron las extracciones con el solvente correspondiente según el método de extracción sugerido por Matsukawa et al. (1997) modificado.

Para los extractos con etanol, a los 0,5 gramos de cada alga se agregaron 10 ml de etanol (96°). Por otra parte, para los extractos con la mezcla etanol: agua (80:20), a los 0,5 gramos de cada alga se agregaron 2 ml de agua destilada y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir su hidratación. Luego, se agregaron 8 ml de etanol (96°). Todos los sistemas obtenidos se almacenaron a 25°C durante 1 hora bajo agitación (100 rpm) proporcionada por un agitador orbital (Vicking, Argentina) y posteriormente, se almacenaron a 4°C por 24 horas. Finalmente, para obtener un extracto límpido, los sistemas se centrifugaron

a 10000 rpm, 15 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804 R, Alemania). El sobrenadante fue colocado en tubos Eppendorf estériles y almacenados en oscuridad a una temperatura de -18°C hasta su uso.

Determinación de polifenoles totales

Los polifenoles totales se cuantificaron aplicando el método de Folin-Ciocalteu, adaptado de Kim et al. (2005). Para ello se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu (10% v/v), el cual se conservó en oscuridad hasta su uso. Se colocó 1 ml de cada extracto en un tubo de ensayos y de agregaron 5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se homogenizó y se preincubó a 25ºC en oscuridad durante 5 minutos. Pasado el tiempo de pre-incubación, se agregaron 4 ml de carbonato de sodio (7,5% p/v) y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones. Finalizada la incubación, se midió la absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. En paralelo se realizó una curva de calibración con ácido gálico abarcando concentraciones entre 20 y 80 mg/l, según lo sugerido por Machu et al. (2015). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por gramo de alga liofilizada.

Determinación de la capacidad antioxidante

Para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos, se determinó la capacidad de cada uno de ellos para inactivar el radical DPPH, según el método indicado por Yen y Chen (1995). Se preparó una solución de DPPH 0,1 mM en etanol absoluto. Luego, se puso en contacto 1,8 ml de dicha solución con 0,2 ml de extracto. Los sistemas resultantes se incubaron durante 30 minutos a 25°C en oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inactivación del radical DPPH según la siguiente ecuación:

$$\%DPPH = \frac{Ab - A}{Ab} x\ 100$$

Donde Ab es la absorbancia del blanco, y A la absorbancia correspondiente a cada una de las muestras. Como blanco se utilizó etanol 96º o una mezcla etanol: agua 4:1, según corresponda.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados llevando a cabo un ANOVA de dos factores (tipo de alga y solvente de extracción), seguido por el Test de Tukey. La significatividad estadística fue evaluada a un nivel de 5% (α=0,05). El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Plus for Windows, versión 5.1, 2001, Estados Unidos.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante

El contenido de polifenoles dependió tanto del tipo de alga estudiada como del método de extracción. La extracción con la mezcla etanol: agua fue más efectiva para las algas *Ulva spp.*, *C. decorticatum*, y *U. pinnatifida*, obteniendo entre 1,86 y 3,02 mg de ácido gálico/g de alga liofilizada. Por el contrario, para el alga *D. dichotoma* la extracción con etanol resultó más efectiva, logrando obtener el mayor contenido de polifenoles de las muestras evaluadas -20,95 mg de ácido gálico /g de alga liofilizada- (**Tabla 1**). Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango reportado por otros autores (Machu et al. 2015). En estudios anteriores, al evaluar diferentes solventes para la extracción, no se encontró una relación directa entre la polaridad del solvente y el nivel de extracción de polifenoles. Para las algas *Eiseniabicyclis*, *Hizhiafusiformis*, *Laminaria japónica*, *Palmaria palmata*, *Porphyratenera* y *Spirulinaplatensis*, el uso de agua como solvente favorece la extracción de polifenoles, en cambio, en el caso de las algas *U. pinnatifida* y *Chlorella pyrenoidosa*, los extractos metanólicos resultan más efectivos. Estos resultados se vinculan al hecho de que un solo solvente no tiene la capacidad para extraer los distintos compuestos polifenólicos presentes (Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al. 2011). Además, el uso de metanol y/o acetona como solvente, permite obtener elevados valores de polifenoles totales (Duan et al. 2006). Es de destacar que el etanol permitió extraer una cantidad de polifenoles semejante a la reportada en otros trabajos y que dicho

solvente, al no ser tóxico, es apropiado para su posterior aplicación en alimentos.

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales (mg de ácido gálico/g alga)

Alga	Extracto etanol 96°	Extracto etanol: agua 80:20
Ulva spp.	0,37 ± 0,11 [a]	2,26 ± 0,01 [e]
Codium decorticatum	1,42 ± 0,03 [b]	1,86 ± 0,02 [f]
Dictyota dichotoma	20,95 ± 1,46 [c]	3,02± 0,08 [g]
Undaria pinnatifida	1,04 ± 0,06 [d]	2,89 ± 0,21 [g]

Los valores señalados con igual letra no son significativamente diferentes (α: 0,05).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las algas estudiadas dependió del tipo de alga y del solvente de extracción utilizado. Los mejores resultados se obtuvieron para los extractos con etanol de las algas *C. decorticatum* y *D. dichotoma* (47,66 y 41,17% de inhibición del radical DPPH, respectivamente) y para el extracto con etanol: agua del alga *Ulva spp.* (44,69% de inhibición del radical DPPH). Los resultados se muestran en la **Tabla 2**. Estos resultados, dependientes tanto del alga como del método de extracción, se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos previamente por Kindleysides et al. (2012), y Kim et al. (2005), quienes observaron valores de inhibición que van del 10 al 90% según el tipo de algas utilizada.

Tabla 2, Actividad antioxidante (% de inactivación del radical DPPH)

Alga	Extracto etanol 96°	Extracto etanol: agua 80:20
Ulva spp.	10,18 ± 1,10 [a]	44,69 ± 0,16 [b]
Codium decorticatum	47,66 ± 0,41 [b]	34,36 ± 1,59 [e]
Dictyota dichotoma	41,17 ± 0,21 [c]	30,31 ± 0,04 [f]
Undaria pinnatifida	26,97 ± 0,52 [d]	27,41 ± 0,81 [d]

Los valores señalados con igual letra no son significativamente diferentes (α: 0,05).

En los alimentos vegetales, los polifenoles comúnmente presentan actividad antioxidante. Distintos autores han encontrado correlaciones positivas entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante (Wangensteen et al. 2004, Bertoncelj et al. 2007). En particular, en numerosas especies de algas marinas se encontró que la actividad antioxidante exhibida por sus extractos acuosos y alcohólicos estaba en relación directa con el contenido de polifenoles (Ismail y Siew 2002, Yuan et al. 2005, Zubia et al. 2007). Sin embargo, esta tendencia no se observa en el caso de las algas evaluadas, lo que sugeriría que la actividad antioxidante sería ocasionada no solo por los polifenoles sino por la acción conjunta de distintos compuestos, tales como clorofila, carotenoides y algunos aminoácidos tipo micosporina (Yan et al. 1999). En cuanto al alga *U. pinnatifida*, ésta presenta actividad neuroprotectora en cultivos de células, posiblemente ocasionada por propiedades antioxidantes, las que se vinculan al contenido de fucoxantina, un derivado carotenoide (Ikeda et al. 2003).

CONCLUSIONES

Los solventes utilizados (etanol 96º y etanol: agua 80:20) resultaron satisfactorios para la extracción de polifenoles y de compuestos con capacidad antioxidante. Aunque previamente se hayan informado mejores resultados con otros solventes, el etanol posee la ventaja de ser más adecuado para la posterior aplicación en la preservación de alimentos.

El solvente más apropiado para la extracción de los compuestos en estudio dependerá de la especie de alga. Para el caso de las algas *D. dichotoma* y *C. decorticatum*, el etanol resulta más efectivo para extraer compuestos con capacidad antioxidante. En cambio, para *Ulva spp*., la mezcla de etanol: agua es más adecuada. En cuanto al contenido de polifenoles, se destaca el extracto etanólico de *D. dichotoma*. Los extractos estudiados presentan potencial para su uso en la preservación de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Adaikalaraj G, Raja P, Johnson M, Janakiraman N, Babu A. 2012. Antibacterial potential of selected red seaweeds from Manapad coastal areas, Thoothukudi, Tamil Nadu India Asian Pacific. Journal of Tropical Biomedicine, 2(2): S1077-S1080.

Alves Pinto A. 2012. Exploring the biomedical potential of a novel algae origin polysaccharide. Minho, Universidade de Minho, 1° edición. Pag 198.

Balboaa EM, Condea E, Mourea A, Falquéc M, Domínguez H. 2013. Review: In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. Food Chemistry, 138: 1764-1785.

Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chemistry, 105: 822-828.

Duan XJ, Zhang W, Li XM, Wang BG. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphoniaurceolata*. Food Chemistry, 95: 37-43.

Ikeda K, Kitamura A, Machida H, Watanabe M, Negishi H, Hiraoka J, Nakano T. 2003. Effect of *Undaria pinnatifida* (wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clinical and experimental Pharmachology and Physiology, 30(1-2): 44-8.

Ismail A, Siew H. 2002. Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. Malaysian Journal of Nutrition, 8(2): 167-77.

Kim S, Woo S, Yun H, Yum S, Choi E, Do JR, Jo JH, Kim D, Lee S, Lee TK. 2005. Total phenolic contents and biological activities of Korean seaweed extracts. Food Science Biotechnology, 14: 798-802.

Kindleysides S, Quek SY, Miller MR. 2012. Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. Food Chemistry, 133: 1624-1631.

Koivikko R. 2008. Brown algal phlorotannins: improving and applying chemical methods. Turku, Finland. Turun Yliopisto, pag 61.

Machu L, Misurcova L, Ambrozova JV, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J, Jurikova T. 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. Open Access Molecules, 20: 1118-1133.

Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda K, Takeuchi T, Chihara T, Yamamoto Y, Niki E, Karube I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. Journal of Applied Phychology, 9: 29-35.

Miranda JM, Trigo M, Barros-Velázquez J, Aubourg SP. 2016. Effect of an icing medium containing the alga *Fucus spiralis* on themicrobiological activity and lipid oxidation in chilled megrim (*Lepidor hombuswhiffiagonis*). Food Control, 59: 290-297.

Parsaeimehr A, Lutzu GA. 2016. Algae as a novel source of antimicrobial compounds: current and future perspectives. En: Kon K, Rai M (Eds.). Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. London: Academic Press in an imprint of Elsevier, pag: 377-396.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Frecha-Ferreiro S, Vidal-Pérez AM, López-Hernández JM. 2011. Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. European Food Research and Technology, 231: 495-498.

Wangesteen KE, Samuelsen H, Malterud AB. 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. Food Chemistry, 88: 293-297.

Yan XJ, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikiafusiformis*, a common edible seaweed. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 63: 605-7.

Yen G, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 43: 27-32.

Yuan YV, Bone DE, Carrington MF. 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmariapalmata*) extract

evaluated in vitro. Food Chemistry, 91: 485- 94.
Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. Journal of Applied Phycology, 18: 449-58.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y de la Universidad Tecnológica Nacional.

Caracterización fisico-química según el origen geográfico de vinos tintos regionales

Di Carlo B.M.(1), Pérez, N.P.(1), Lenz R.M.(1), Gómez R.V.(1), Salomón R.(2), Moyano F.(1), Peñaranda S.S.(1), Zerpa G.(1), Navia F.(1), Rabus P.(1), Buttazzoni R.(1)

(1) Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ciencias Exactas, Avda Bolivia 5150, Salta, Argentina
(2) Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ingeniería, Avda Bolivia 5150, Salta, Argentina 2. Facultad de Ingeniería, Argentina.
bertadcar@yahoo.com.ar

RESUMEN

La caracterización fisico-química del vino es importante para su futura denominación de origen. El objetivo de éste trabajo es caracterizar físico-químicamente los vinos tintos de los Valles Calchaquíes de Salta, Argentina. Se analizaron 43 muestras de vinos tintos, varietales *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* y *Syrah*, provenientes de Cafayate, Molinos, Tolombón y Angastaco. Se utilizaron técnicas de análisis del Instituto Nacional de Vitivinicultura para determinar azúcares, extracto seco, alcohol, acidez total y volátil, pH, densidad, anhídrido sulfuroso total y libre. Los resultados físico-químicos de extracto variaron de 19,4 a 34,8 g/L; acidez total de 3,03 a 4,91 g/L, la volátil entre 0,36 a 1,07 g/L, azúcares de 1,87 a 7,5 g/L; grado alcohólico de 13 a 15,3 °v/v y el anhídrido sulfuroso total de 2,65 a 22,8 mg/L; con valores del libre de 0,6 a 1,98 mg/L para estos vinos regionales. Los varietales *Malbec* de Angastaco poseen mayores valores de acidez total (5,07 g/L) y extracto (29,7 g/L) que los de las otras zonas geográficas. Los varietales *Cabernet Sauvignon* de Angastaco, Molinos y Tolombón registran máximos valores de extracto y azúcares, siendo los mejores los vinos de Angastaco elaborados a 2000 m, muy apreciados en el mercado nacional e internacional.

Palabras claves: vinos tintos, físico-química, origen geográfico.

ABSTRACT

The physico-chemistry characterization of the wine is importance for your future origin denomination. The objective of this work is to determine the physical and chemical characteristics of regional red wines from Calchaquies Valleys of Salta in Argentine. We analyzed 43 red wines variety *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* and *Syrah*, from Cafayate, Molinos, Tolombón and Angastaco. We have used analysis techniques from National Wine Institute to determine sugars, dry extract, alcohol, acidity, pH, density and sulfur dioxide total and free. The physicochemical results showed dry extract between 19.4 to 34.8 g / L, total acidity of 3.03 to 4.91 g/ L tartaric acid, volatile acidity of 0.36 to 1.07 g/L, sugars between 1.87 to 7.5 g/L, alcohol of 13 to 15.3 ºv/v and total sulfur dioxide between 2.65 to 22.8 mg/L being the values of free 0.6 to 1,98 mg/ L. The *Malbec* variety from Angastaco showed the maximum values of total acidity content (5.07 g/L) and extract (29.7 g/L) that wines from other geographical areas. The *Cabernet Sauvignon* variety from Angastaco, Molinos and Tolombón showed the maximum values of extract and sugar being the best wines from Angastaco produced to 2000 meters, appreciate at the local and international market.

Keywords : red wines, physico-chemistry, geographical origin.

INTRODUCCIÓN

Los Valles Calchaquíes en Salta, está integrado por los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi, donde existen 26 bodegas con más de 3.200 hectáreas de viñedos, algunas a 3.111 m sobre el nivel del mar, que proporciona características propias a las uvas y vinos regionales. Se

caracterizaron físico-químicamente vinos tintos de los Valles Calchaquíes producidos en forma tradicional y orgánica en Salta, Argentina. En Salta el 55,51 por ciento de la superficie sembrada está compuesta por las uvas tintas, siendo los varietales más difundidos *Cabernet Sauvignon* con el 44,8%, seguido por *Malbec* con el 31,84%, *Merlot* con el 7,7%, *Syrah* con el 5,31%y *Tannat* con el 5,24%(INV,2013).

El vino contiene sustancias que forman el extracto, el sabor y el aroma, contiene un 75 a 90% de agua y etanol en un rango de 9 a 14%, que puede llegar hasta un 21%. Los azúcares que se pueden encontrar en el vino son principalmente glucosa y fructosa, y en menor proporción galactosa, manosa, celobiosa, rafinosa, arabinosa, xilosa y ribosa. La acidez titulable es una medida de los ácidos orgánicos del vino y representa la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución alcalina valorada (Peynaud, 1996).

El vino presenta también compuestos que contienen azufre; el anhídrido sulfuroso aparece durante la fermentación de las uvas con alto contenido de azufre elemental, también tioles y tioésteres, Las sustancias fijas que constituyen el extracto del vino y el alcohol afectan la intensidad del aroma, dando características propias del flavor (Rapp y Mandery, 1986).

El varietal Malbec se ha convertido en el típico vino tinto argentino, siendo necesario alcanzar por consenso criterios respecto de la madurez de la uva, maceración y períodos de añejamiento en botella y barrica.

Cada región vitivinícola está marcada por características propias, hay áreas con climas y suelos diferentes que favorecen el cultivo de varias cepas y la producción de amplia variedad de estilos de vinos, por ello es de importancia el estudio de las características física-químicas de los vinos tintos de los Valles Calchaquíes, de la provincia de Salta en Argentina.

Nuestro objetivo es caracterizar fisico-químicamente los vinos tintos regionales provenientes de bodegas de estos valles salteños; contribuyendo a aumentar su valor agregado, además de aportar datos que son exigidos para gestionar una futura denominación de origen. Esta caracterización de los vinos es de importancia dado que cada región vitivinícola posee climas y suelos diferentes, así en nuestra zona se cultivan en forma orgánica y tradicional uvas de variedades *Cabernet Sauvignon, Malbec, Syrah* y *Tannat* en Cafayate, Molinos, Tolombón y Angastaco que producen vinos tintos regionales con flavor, color y aroma que diferencian su origen geográfico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron 43 muestras de vinos tintos, 19 varietales *Malbec*, 15 de *Cabernet Sauvignon*, 6 de *Tannat* y 3 de *Syrah*, 27 provenientes de Cafayate y el resto de las regiones de Alto Cafayate, Molinos, Tolombón, Angastaco (4 muestras de cada una).

Análisis físico químicos

Se utilizaron técnicas de análisis del Instituto Nacional de Vitivinicultura para determinar azúcares, extracto seco, alcohol, acidez total y volátil, pH, densidad, anhídrido sulfuroso total y libre (INV, 2007).

Análisis Estadísticos

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados fisicoquímicos de los vinos tintos regionales presentaron valores de extracto que variaron de 19,4 a 34,8 g/L; acidez total de 3,03 a 4,91 g/L, la volátil entre 0,36 a 1,07 g/L, azúcares de 1,87 a 7,5 g/L; el grado alcohólico fue de 13 a 15,3 °v/v y el anhídrido sulfuroso total de 2,65 a 22,8 mg/L; con valores del libre de 0,6 a 1,98 mg/L, estos datos indican que son vinos varietales con buen contenido de sólidos, azúcares y acidez, como se puede observar en la **tablas 1** y **2**.

Desde el punto de vista químico, el vino es una solución hidroalcohólica que contiene varias sustancias que forman el extracto y dan sabor, y otras tantas sustancias volátiles que constituyen el aroma. En los vinos

regionales analizados el contenido alcohólico varió entre 13 al 15,3 %v/v que indica un buen tenor de alcohol. La función principal de esta mezcla es la de ser el solvente del resto de los componentes; entre ellos, el metanol que es un producto de la hidrólisis de las pectinas con un contenido promedio de 100 mg/l, mayor en el vino tinto que en el blanco.

Los ácidos más frecuentes en el vino son el tartárico, málico y láctico. Los primeros provienen de la uva y el último se produce a partir de la fermentación del segundo por las bacterias lácticas. Otros ácidos minoritarios en el vino son el acético, cítrico, ascórbico, succínico, glucónico (Peynaud, 1996).

En la **tabla 1** se puede comparar los parámetros fisicoquímicos de los vinos tintos regionales producidos con técnicas tradicionales con los de producción orgánica provenientes de distintas zonas de Cafayate en los Valles Calchaquíes de Salta.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los vinos tintos regionales de Cafayate

Datos fisicoquímicos Promedios	**Variedades de vinos tintos con producción tradicional de Cafayate**					**Vinos tintos orgánicos de Cafayate**		
	Syrah	***Tannat***	***Malbec***		***Cabernet Sauvignon***	***Tannat***	***Malbec***	***Cabernet Sauvignon***
			Caf	***Alto Caf.***				
Acidez total (g/L ácido tartárico)	4,15[a]	3,7[b]	3,93c[c]	4,6[d]	4,11[a]	4,32[e]	4,91[e]	3,98c[c]
Acidez volátil (g/L ácido acético)	0,45[a]	0,42[a]	0,56[b]	0,87[c]	0,59[b]	0,57[b]	0,36[d]	0,54[b]
pH	3,7[a]	3,7[a]	3,6[b]	3,8[c]	3,7[a]	3,9[d]	3,7[a]	3,8[c]
Densidad	0,990[a]	0,990[a]	0,991[a]	0,990[a]	0,990[a]	0,990[a]	0,990[a]	0,991[a]
Extracto seco(g/L)	19,4[a]	22,72[b]	23,65[c]	26,5[d]	27,2[d]	29,45[e]	33,24[f]	34,8[g]
Azúcares (g/L)	2,8[a]	3,5[b]	5,09[c]	2,9[a]	5,39[c]	3,9[b]	3,56[b]	3,54[b]
Alcohol (%v/v)	13[a]	14,0[b]	14,0[b]	14,8[b]	14[b]	15,3[c]	14,8[b]	14,5[b]
Anhídrido Sulfuroso total (mg/L)	22,8[a]	11,1[b]	15,5[c]	10,5[b]	7,38[d]	6,1[e]	5,4[be]	6,6[e]
Anhídrido Sulfuroso libre (mg/L)	1,59[a]	0,6[b]	1,41[c]	1,3[d]	1,48[c]	0,75[e]	1,48[c]	1,48[c]

Letras diferentes por fila son diferencias significativas por test de Tukey ($p \leq 0,05$). Caf. = Cafayate

El análisis estadístico de los resultados físico-químicos determinó diferencias significativas entre las variedades de vino de cada región vitivinícola para $p<0,05$ para todos los parámetros excepto la densidad que se muestran en las **tablas 1** y **2**. Analizando la **tabla 1** de los vinos elaborados en la zona de Cafayate, los varietales *Cabernet, Malbec* y *Tannat* de producción orgánica, presentan los mayores contenidos de extracto, acidez total y alcohol que los vinos con producción tradicional, con valores de 34,80 g/L;4,91 g/L y 15,3ºv/v; respectivamente.

Comparando los valores físico-químicos de los vinos tintos regionales en las **tablas 1** y **2**, se observa que los varietales *Malbec* de Angastaco poseen mayores valores de acidez total (5,07 g/L) y extracto (29,7 g/L) que los de las otras zonas geográficas. Los varietales *Cabernet Sauvignon* de Angastaco, Molinos y Tolombón registran máximos valores de extracto y azúcares, siendo los mejores los vinos de Angastaco con extracto de

32,30 g/L y 7,5 g/L de azúcares; además de presentar buen tenor alcohólico de 14,8 °v/v y bajos valores de anhídrido sulfuroso total (14,55 mg/L) y libre (0,66 mg/L), considerando estos vinos de altura, ya que se elaboran a 2000 m, por lo que son muy apreciados en el mercado nacional e internacional.

El extracto seco es un dato importante para caracterizar a un vino, dado que contribuye a ofrecer una apreciación de la naturaleza del vino tinto, porque determina el residuo fijo obtenido después de la evaporación de sustancias volátiles. El dulzor de un vino está relacionado con los azúcares reductores; el cuerpo con la densidad, el alcohol y el extracto seco y la acidez con los ácidos orgánicos. (Ribéreau-Gayon *et al*, 2006)

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de vinos tintos de Molinos, Tolombón y Angastaco

Datos fisicoquímicos Promedios	**Variedades de vinos tintos de Molinos**		**Variedades de vinos tintos de Tolombón**		**Variedades de vinos tintos de Angastaco**	
	Malbec	***Cabernet Sauvignon***	***Malbec***	***Cabernet Sauvignon***	***Malbec***	***Cabernet Sauvignon***
Acidez total (g/L ácido tartárico)	3,56[a]	3,7 [a]	4,91c[b]	4,13 [c]	5,07[b]	3,03 [d]
Acidez volátil (g/L ácido acético)	0,75[a]	1,07 [b]	0,86[c]	0,75 [a]	0,50[d]	0,42 [d]
pH	3,7 [a]	3,7 [a]	3,7 [a]	3,5 [b]	3,8 [c]	3,8 [c]
Densidad	0,998 [a]	0,990 [a]	0,991 [a]	0,990 [a]	0,991 [a]	0,990 [a]
Extracto seco(g/L)	24,2 [a]	28,1 [b]	27,2 [c]	27[dc]	25 [c]	27,2 [d]
Azúcares (g/L)	2,15 [a]	6,5 [a]	2,8 [a]	7,25 [a]	4,9 [d]	7,5 [a]
Alcohol (%v/v)	14,5 [a]	14,4 [a]	13,8 [b]	13,85 [b]	14,85 [c]	14,8 [c]
Anhídrido Sulfuroso total (mg/L)	13,23 [a]	11,9 [b]	9,26 [c]	11,6 [b]	2,65 [d]	14,5 [e]
Anhídrido Sulfuroso libre (mg/L)	0,66 [a]	0,7 [a]	1,98 [b]	1,32 [c]	1,32 [c]	0,66 [a]

Letras diferentes por fila son diferencias significativas por test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Los valores de pH, acidez total y extracto seco encontrados están entre los normales comparados con los valores obtenidos en vinos mendocinos (Catania, 2005), con considerable contenido de sólidos, que le otorgan cuerpo al vino tinto, además de los azúcares que le proporcionan el dulzor.

Gawel (1998) afirmó que el vino contiene varias clases de sustancias que contribuyen a la viscosidad, entre ellas el etanol, el glicerol, los polisacáridos, los monosacáridos y los azúcares reductores. Gawel *et al.* (2007) determinaron que el incremento del nivel de alcohol se traduce en un leve incremento del cuerpo en vinos modelo.

Respecto a la acidez volátil no superaron los máximos de 2 g/L establecidos en el Código Alimentario Argentino, siendo los vinos de la variedad *Cabernet*, proveniente de la localidad de Molinos presentan los mayores valores de ésta acidez con 1,07 g/L.

En los últimos tiempos la industria vitivinícola busca reducir el uso del anhídrido sulfuroso, dado que su oxidación progresiva con el tiempo aumenta la acidez del vino, que si se incrementa en exceso resulta poco beneficiosa para su calidad. Además, éste antiséptico ha sido reportado por algunos consumidores como fuente de alergias afectando la salud.

El vino tinto de la variedad *Syrah* proveniente de Cafayate, elaborado con técnicas tradicionales, posee los mayores contenidos de anhídrido sulfuroso total de 22,8 mg/L y el varietal *Malbec* de Tolombón registra los mayores contenidos del libre (1,98 mg/L), pero no supera los máximos establecidos por el Código Alimentario Argentino (2010) de 20 mg/L en el valor del libre y 300 mg/L en el total. Los valores totales menores de éste compuesto químico lo registraron los vinos varietales *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* de Angastaco con valores de 2,65 y 0,66 para el anhídrido sulfuroso total y libre, respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados físico-químicos determinó diferencias significativas entre las variedades de vino de cada región vitivinícola para $p<0,05$; se aplicó análisis multivariado de componentes

principales para los vinos producidos en cada zona, para varietales de Cafayate, elaborados en forma tradicional y orgánica, este análisis graficado en la figura 1, demuestra que la primera componente explica el 41,9% de la variabilidad de los resultados entre las variedades de vinos tintos regionales de la zona de Cafayate y el 22,5% la componente 2 como se observa en la **figura 1**.

Existe una asociación de los vinos de las variedades *Malbec, Tannat* y *Cabernet Sauvignon* elaborados en forma orgánica con los mayores valores de extracto seco, alcohol, pH y acidez total, que proveen buen cuerpo y contenido alcohólico a estos varietales. El extracto seco es un dato importante para caracterizar a un vino, dado que está relacionado con el cuerpo del vino tinto, mientras que los azúcares con el dulzor. También se vincula el cuerpo con la densidad y el contenido alcohólico, mientras que la acidez del vino está determinada por los ácidos orgánicos. Por otra parte, los vinos varietales *Malbec, Cabernet* y *Tannat* elaborados con técnicas tradicionales se asocian con los mayores valores de azúcares, acidez volátil , anhídrido sulfuroso libre y total de 0,84, 0,59 g/L y 4,75 g/L, respectivamente.

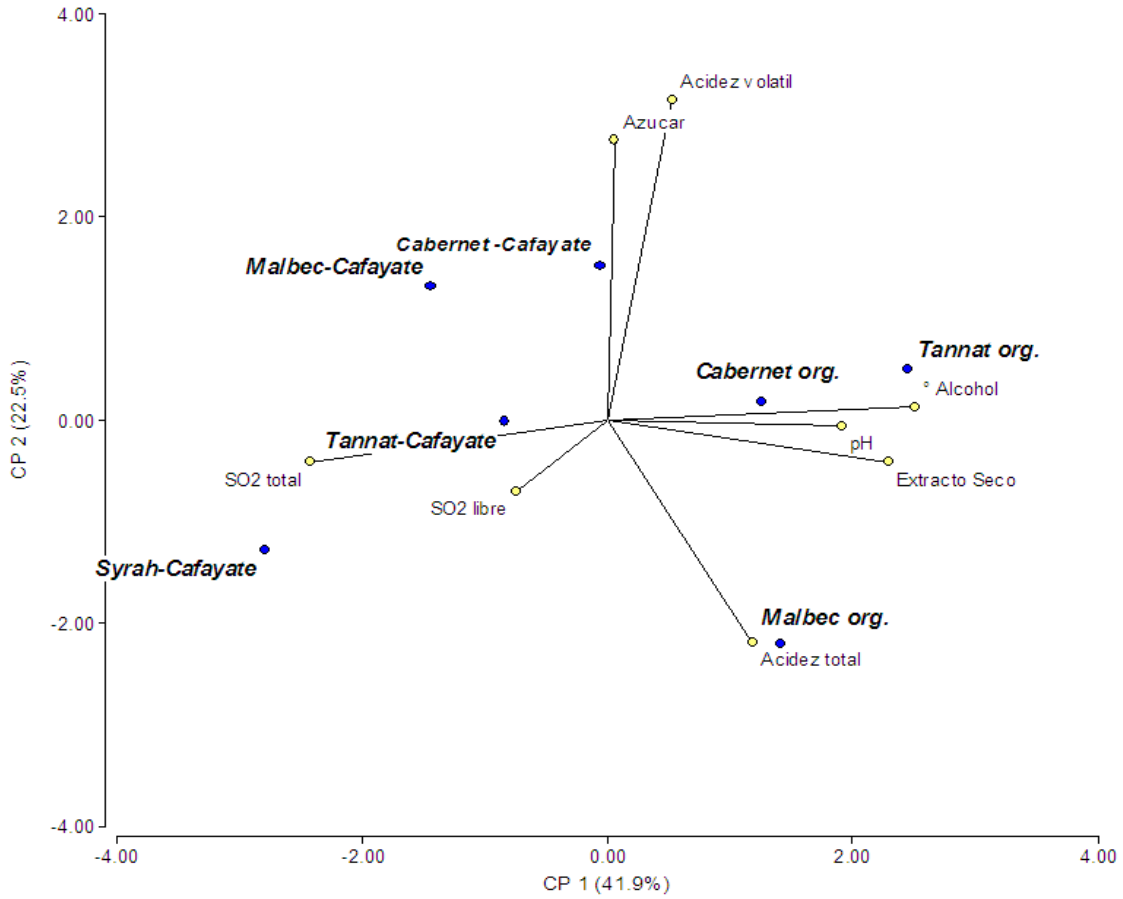


Figura 1.Análisis multivariado de vinos tintos regionales de la zona de Cafayate (org.=orgánico)

En los Valles Calchaquíes existen bodegas con pequeños volúmenes de producción, del orden de 500 mil litros, por lo que es importante el análisis físico-químico de los vinos regionales para aumentar el valor agregado de estos vinos, que son producidos en un 70% por la zona vitivinícola de Cafayate, favoreciendo su comercialización tanto a nivel nacional como internacional.

Los vinos tintos varietales analizados son vinos jóvenes, de un año de edad, con características cromáticas que presentan mayor proporción del color rojo que los vinos de mayor edad, con buena relación de calidad y precio, destinados al consumo diario y en el último tiempo están siendo preferidos por los consumidores más

que los vinos más envejecidos de mayor precio en el mercado. En ésta zona vitivinícola, las bodegas destinan la mayor parte de la cosecha a la producción de vinos jóvenes satisfaciendo la demandas locales y recuperando a corto plazo la inversión realizada.

Las sustancias fijas que constituyen el extracto del vino también afectan la intensidad del aroma. El alcohol, puede tener un efecto supresor o intensificador de aromas. De esto también deriva un tipo de balance entre los aromas frutales y los aromas derivados de la uva, del pasaje por madera y de los taninos debido a los fenoles: los taninos enmascaran los aromas frutales; y puede haber, entonces, vinos con un aroma particular de la variedad, vinos con excesivo aroma fenólico, vinos balanceados con taninos suficientes para ser guardados que a la vez retienen la frescura del aroma primario (Peynaud, 1996)

En el análisis multivariado de componentes principales de los vinos tintos regionales producidos con técnicas tradicionales en las distintas regiones geográficas (Cafayate, Molinos, Tolombón y Angastaco), como se observa en la figura 2, la primera componente explica el 41,2% de la variabilidad de los resultados, mientras que la componente 2 el 30,8%.

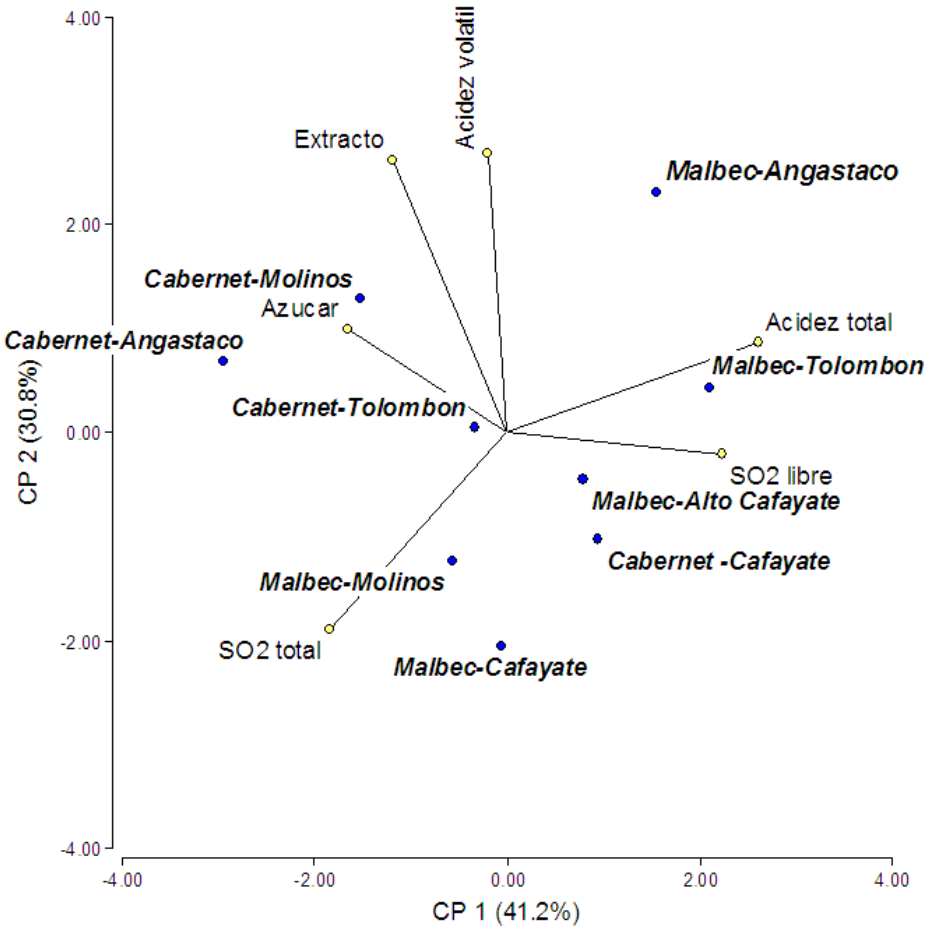


Figura 2.Análisis multivariado de vinos tintos regionales de los Valles Calchaquíes

Se observa en la **figura 2** que los varietales *Malbec* de Angastaco poseen mayores valores de acidez total (5,07 g/L) y extracto (29,7 g/L) que los de las otras zonas geográficas, con alta acidez volátil de 0,95 g/L, pero que no supera los máximos del Código Alimentario Argentino.

Existe asociación entre los varietales *Cabernet Sauvignon* de Angastaco, Molinos y Tolombón con máximos

valores de extracto y azúcares, siendo los mejores los vinos de Angastaco con extracto de 32,30 g/L y 7,5 g/L de azúcares; además de presentar buen tenor alcohólico de 14,8 °v/v y bajos valores de anhídrido sulfuroso total (14,55 mg/L) y libre (0,66 mg/L), considerando estos vinos de altura, ya que se elaboran a 2000 m, por lo que son muy apreciados en el mercado nacional e internacional.

El anhídrido sulfuroso introducido en un vino se combina en pocas horas con los cuerpos de función carbonilo como etanal, azúcares, ácido pirúvico, etc. para formar el anhídrido sulfuroso combinado que se encuentra en equilibrio con el libre. La cantidad del anhídrido sulfuroso libre depende de la temperatura del vino, así se observó que incrementa en épocas de primavera y verano, además de relacionarse con la aireación del vino que aumenta notablemente su cantidad. (Peynaud, 1996)

El anhídrido sulfuroso combinado no protege al vino de alteraciones microbianas y resulta nefasto para el gusto del vino, que adquiere un sabor azufrado. Si bien es un auxiliar para el vinificador, debe ser usado con precaución para evitar aromas o gustos desagradables, o favorecer ciertos enturbiamientos durante la conservación. (Ribéreau-Gayón *et al*, 2006)

El reconocimiento de la calidad de vinos regionales, en base a sus características físico-químicas y sensoriales, es un primer paso para lograr la denominación de origen controlada (DOC), cumplimentando la ley 25.163 de normas para la designación y presentación de vinos y bebidas espirituosas de origen vínico, que exige para otorgar la DOC de una región, provincia, departamento, distrito, localidad o área del territorio nacional, que sea un producto originario con cualidades o características debidas al medio geográfico, comprendidos los factores naturales y los factores humanos. Se aplica a vinos de variedades selectas, de calidad superior, producidos en una región diferenciada, cuya materia prima y elaboración, crianza y embotellado se realicen en la misma área de producción delimitada.

La región de los Valles Calchaquíes, comprendida por los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi, puede lograr una DOC, por las características fisico-químicas y sensoriales de sus vinos tintos, que les proporcionan una particular apariencia, sabor, color y sensación en boca, de acuerdo a su composición de extracto, alcohol, densidad, pH, acidez total y volátil.

CONCLUSIONES

Estos resultados contribuyen a caracterizar a los vinos tintos de los Valles Calchaquíes de Salta, siendo de importancia para determinar su calidad y valor agregado, también serán de utilidad para gestionar, en un futuro, la denominación de origen controlada. Los vinos tintos regionales poseen un buen tenor alcohólico, considerable extracto seco, acidez y pH normales, que proporcionan a los vinos un buen cuerpo y sensación de completud, especialmente en los vinos de las variedades *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* provenientes de Angastaco elaborados a 2000 m, además de registrar bajos valores de anhídrido sulfuroso, siendo estas características valoradas en el mercado nacional e internacional. Es de destacar que todos los vinos tintos regionales no superaron los máximos permitidos para éste conservante, que es un auxiliar para la vinificación y debe ser usado con precaución para evitar aromas o gustos desagradables, además de producir reacciones alérgicas en algunas personas.

Del análisis multivariado se concluye que existe una asociación de los vinos de las variedades *Malbec, Tannat* y *Cabernet Sauvignon* elaborados en forma orgánica en Cafayate con los mayores valores de extracto seco, alcohol, pH y acidez total, que proveen buen cuerpo y contenido alcohólico a estos varietales. Con respecto a los vinos regionales de las otras zonas geográficas de los Valles Calchaquíes, los vinos varietales *Cabernet Sauvignon* de Angastaco poseen mayor extracto (32,30 g/L) y azúcares (7,5 g/L); además de presentar buen tenor alcohólico de 14,8 °v/v y bajos valores de anhídrido sulfuroso total (14,55 mg/L) y libre (0,66 mg/L), considerando estos vinos de altura elaborados a mas de 2000 metros de altura con mayor valor agregado de comercialización.

BIBLIOGRAFÍA

Catania CD. 2005. Influencia de distintos sistemas de maceración sobre el color, la composición polifenólica

y las características organolépticas de vinos cv. *Merlot* de la zona alta del río Mendoza. Mendoza: INTA. Informe 03/18305. pag 18.
Código Alimentario Argentino (CAA). 2010. Artículo 1104. Cap. XIII. http://www.anmat.gov.ar
Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2007. Manual de Técnicas Analíticas. Mendoza: Instituto Nacional de Vitivinicultura. pag107.
INV.2013.www.inv.gov.ar.
Gawel R. 1998. Red wine astringency: a review. Australia. Journal Grape Wine Research, 4: 74-95.
Gawel R, Van Sluyter S, Waters EJ. 2007. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. Australia. Journal of Grape and Wine Research, 13, 38-45.
Peynaud E.1996. Balance in wine. New York, USA : 2º Ed. John Wiley & Sons, Inc., pag 188
Rapp A, Mandery H.1986. Wine aroma. Experiencia, 42: 873-884.
Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudrad P, Riberéreau- Gayon P. 2006. Ciencias y Técnicas del vino. Buenos Aires: Hemisferio Sur. pag 537.

Características fisicoquímicas y tecnológicas de almidones de mandioca fermentados

Díaz A (1), Dini, C (1), Viña, S (1), García, MA (1)

CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos), Facultad Ciencias Exactas UNLP – CONICET La Plata - CICPBA, 47 y 116 S/Nº, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina.
andree.diaz@hotmail.com

RESUMEN

Se estudió el efecto de la fermentación sobre las características fisicoquímicas y tecnológicas del almidón de mandioca. Se realizó la extracción acuosa del almidón, y se fermentó dejándolo en contacto con el sobrenadante de decantación durante 20 días a 20ºC. Se estudiaron dos tipos de secado del almidón: al sol (FS) y en estufa a 40ºC (FE). El sobrenadante obtenido se ensayó a su vez como starter para la fermentación de almidón nativo de mandioca, y posterior secado al sol (SS) y en estufa (SE). Los microorganismos predominantes en el starter fueron hongos, levaduras y bacterias Gram-positivas, con un valor de pH final de 3,8. Se evidenció una modificación de los gránulos luego de ambas fermentaciones. Los valores de pH de las suspensiones de los almidones obtenidos fueron superiores (p<0,05) para los secados al sol, en ambas fermentaciones. La fermentación modificó ligeramente los parámetros de color a*, b* y L* de los almidones, el DSC mostró una disminución de su temperatura de gelatinización, sin diferencias significativas entre métodos de fermentación y secado. Las pastas de todos los almidones presentaron un comportamiento pseudoplástico-tixotrópico, y los espectros dinámicos mostraron las características viscoelásticas del sistema.

Palabras clave: almidones fermentados, secado, acidez, caracterización fisicoquímica, comportamiento reológico

ABSTRACT

The effect of the fermentation in the physicochemical and rheological characteristics of cassava starch was studied. Starch was extracted using water, the starch slurry was decanted and left in contact with the decantation supernatant for 20 days at 20°C for the fermentation process. Two types of drying were studied: sun-drying and oven-drying at 40°C. The supernatant obtained from this process was used as a starter for the fermentation of a native starch sample, and this fermented starch was oven-dried at 40ºC or sun-dried, as previously described. The main microorganisms present in the starter were fungus, yeasts and Gram positive bacteria, and had a pH of 3.8. Microscopic observation of the starch showed granules integrity was reduced after the fermentation. The pH of starch suspensions was significantly lower (p<0.05) for the oven dried starches with respect to the sun dried ones for both fermentation processes. Color parameters a*, b* and L* of the fermented starches were slightly modified. Fermentation also diminished the gelatinization temperature of the starches, but no significant difference (p>0.05) was observed among the different fermentation and drying processes. Starch pastes exhibited a pseudoplastic-thixotropic behavior, and the dynamic spectra showed the viscoelastic characteristics of the system.

Keywords: fermented starches, drying, acidity, physicochemical characterization, rheological behavior.

INTRODUCCIÓN

La mandioca es un cultivo que se consume regularmente en más de 90 países, principalmente de África, Asia y América Latina (Dini et al. 2014). El almidón es el principal producto derivado de la mandioca y es una materia prima muy utilizada gracias a sus características reológicas y de cocción, siendo su temperatura de gelatinización inferior a la de almidones de cereales tales como maíz y trigo, lo cual representa una ventaja para procesos industriales, y además presenta baja tendencia a la retrogradación (Dini et al. 2014). El

almidón fermentado de mandioca, denominado almidón agrio en Colombia y *amido azedo* o *polvilho azedo* (almidón ácido) en Brasil, es utilizado para la elaboración de pandebono y pan de yuca en Colombia, y para hacer *pão de queijo* (pan de queso) en Brasil. En África, este almidón fermentado se conoce como *gari* en los países del Este y del Oeste, y *chikwangue* o *fufu* en África Central (Dufour et al. 1996).

Las principales características de este producto son su sabor y aroma, debido principalmente a la presencia de ácido láctico, generado a través de la fermentación por bacterias lácticas, y su capacidad de producir panificados de mayor volumen que aquellos elaborados con el almidón dulce (no fermentado), gracias a una mayor capacidad de retención de gas en sus masas (Mestres et al. 1996). Esta es una característica muy atractiva, principalmente en el mercado de los productos panificados libres de gluten, donde la densidad de la miga suele reducir la palatabilidad de los mismos.

En Argentina no se produce esta materia prima y el mínimo consumo que existe en el país se abastece por importación desde Brasil. El proceso industrial tradicional consiste en la extracción acuosa del almidón de las raíces de mandioca, el cual se almacena en tanques fermentadores de 0,5 a 5 toneladas de capacidad, y el proceso dura entre 20 y 60 días, dependiendo de las condiciones climáticas del lugar (temperaturas entre 15 y 25°C). Cuando ocurre la fermentación láctica, el pH de las suspensiones de almidón cae a valores de 3,5-4. Es ahí cuando la torta fermentada se extrae y el almidón se dispone en bandejas o en lonas plásticas en el suelo para ser secado al sol. Se ha determinado que ambos procesos, la fermentación y el secado al sol, influyen en las características distintivas de estos almidones para la elaboración de panificados (Dufour et al. 1996).

En este trabajo se analizaron las características de almidones de mandioca fermentados por dos métodos: fermentación natural (F), con la proliferación de la flora propia de las raíces, y con starter (S), iniciando la fermentación con un inóculo obtenido de una fermentación previa. Se realizó un seguimiento del proceso de fermentación por medida del pH del sobrenadante durante los 20 días del proceso y se determinó el tipo de microorganismos involucrados en el mismo mediante tinción de Gram de los sobrenadantes generados. Asimismo, se analizaron las características de los almidones agrios obtenidos por ambos procesos de fermentación y con diferentes procesos de secado: al sol (FS y SS) y en estufa a 40°C (FE y SE). Se evaluó la acidez de los almidones por medida del pH de suspensiones acuosas de los mismos, se analizó la integridad de las partículas para determinar si hubo una modificación de la morfología de los gránulos por el proceso de fermentación, se determinaron los parámetros de color de los almidones y su temperatura de gelatinización por DSC y se evaluaron las características reológicas de las pastas frescas y de las pastas retrogradadas durante 72h a 4°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y fermentación de almidón de mandioca

Las raíces de mandioca (variedad Rocha) fueron desinfectadas con agua clorada (250 ppm cloro, 10 minutos) para reducir la carga microbiana superficial, peladas y ralladas con mandolina. La masa total de dividió en 3 bachas (2,4 kg de raíz procesada por bacha), a cada una se les adicionaron 5 L de agua corriente y se procesaron con minipimer. Las bachas se dejaron 24 h a 4ºC; posteriormente se filtraron con muselina para remover el bagazo, y la lechada de almidón se dejó decantando en las respectivas bachas a 4ºC durante 24h. Luego se eliminó el sobrenadante de la bacha #1 y el almidón decantado se llevó a secar a 40ºC (almidón nativo). Las bachas 2 y 3 se taparon con papel film y se llevaron a 20ºC para iniciar la fermentación.

Se midió pH de cada uno de los sobrenadantes a lo largo de los 20 días de fermentación utilizando un electrodo de vidrio. Pasado este tiempo, se retiraron los almidones decantados de cada bacha, se pesaron y se dividieron en dos partes iguales: una parte fue a secado en estufa a 40ºC y la otra a secado al sol (FE y FS, respectivamente). El sobrenadante obtenido de cada bacha se reservó para ser utilizado como starter en la siguiente fermentación. Se tomó una alícuota (100 µl) de este sobrenadante para realizar un extendido en portaobjetos y tinción de Gram, a fin de ver en líneas generales el tipo de microorganismos que proliferaron durante la fermentación.

Fermentación del almidón de mandioca utilizando un starter

Se pesaron en 2 bachas respectivamente 100 g almidón nativo de mandioca, a cada uno se les adicionaron 1,9 L de agua corriente + 100 ml de los sobrenadantes de las bachas 2 y 3 obtenidos de la fermentación anterior. Se dejaron fermentando tapadas a 20ºC y se midió el pH del sobrenadante a lo largo de la fermentación. Los almidones de cada bacha se dividieron en dos partes iguales, una fue secada al sol y la otra en estufa a 40ºC, tal como se mencionó anteriormente (Almidones SS y SE, respectivamente).

Caracterización de los almidones

Acidez

Se realizó una suspensión al 10 % p/v de cada una de las muestras de almidón, se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se centrifugó y se midió el pH de cada sobrenadante.

Evaluación de la integridad de las partículas por microscopía óptica

Se realizó un extendido de suspensiones acuosas de cada uno de los almidones analizados en un portaobjetos y los gránulos se tiñeron con lugol para incrementar el contraste. Se evaluó la integridad y tamaño de los gránulos por microscopía óptica, utilizando un objetivo con aumento de 40x .

Color

Se caracterizó el color de los almidones obtenidos de las diferentes fermentaciones y el nativo utilizando un colorímetro CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Japón). Los valores de la escala CIE empleada se expresaron en términos de luminosidad (L*), coordenada rojo-verde (valor a*), y coordenada azul-amarillo (valor b*).

Propiedades térmicas: DSC

Se prepararon suspensiones de almidón al 20% p/p en agua destilada y se sometieron a un programa de calentamiento de 10 a 120° C, a una velocidad de barrido de 10°C/ min. Una vez corridas las muestras, las cápsulas se perforaron y se llevaron a estufa a 105°C hasta peso constante para determinar el peso seco de la muestra.

A partir de los termogramas se estimaron las temperaturas (°C) de pico (T_p) y de inicio (T_0) de la transición así como la entalpía (ΔH) correspondiente al área de los picos, expresada como J/g (en base seca).

Propiedades reológicas

Los ensayos reológicos se realizaron en un reómetro Rheo Stress 600 ThermoHaake (Haake, Alemania) usando un sistema plato-plato PP35 con una separación entre platos de 1mm, a temperatura controlada (20°C). Las pastas se prepararon a partir de suspensiones acuosas de almidón (5% p/p) las cuales fueron gelatinizadas a 90°C durante 20 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente.

Para investigar el comportamiento de flujo de las suspensiones de almidón se utilizó el modo rotacional donde se registró el esfuerzo de corte variando la velocidad de deformación desde 0 hasta 500 s^{-1} en un lapso de 3 min, manteniendo a máxima velocidad (500 s^{-1}) durante 1 min y luego descendiendo con el mismo gradiente y tiempo (tiempo total de corrida: 7 min).

Se calculó la viscosidad aparente a 500s^{-1} y para evaluar la dependencia con el tiempo se determinaron los índices de tixotropía, que corresponden al área de histéresis entre las curvas ascendente y descendente. El comportamiento de flujo se modeló matemáticamente utilizando el modelo de Ostwald de Waele:

$$\tau = k\,\dot{\gamma}^{\,n}$$

Donde τ es el esfuerzo de corte, k es el índice de consistencia, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y n es el índice de flujo.

Para caracterizar el comportamiento viscoelástico de las suspensiones de almidón gelatinizadas se realizaron ensayos en modo dinámico. Se realizaron barridos de frecuencia a un valor de esfuerzo constante de 1 Pa, dentro del rango de viscoelasticidad lineal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación al acondicionamiento de la materia prima previo a la extracción del almidón, cabe aclarar que la desinfección descripta se llevó a cabo sobre las raíces con cáscara, principalmente para eliminar la carga microbiana proveniente del suelo. Mediante este pre-tratamiento se buscó favorecer el desarrollo de los microorganismos capaces de fermentar el almidón por sobre aquellos que no pueden utilizar esta fuente de carbono.

Durante el proceso de fermentación natural y con starter de los almidones, se monitoreó el pH de los sobrenadantes a lo largo de los 20 días del proceso. Los perfiles de pH obtenidos se muestran en la **Figura**

1A.
Como era de esperarse, en la fermentación natural se produjo al principio una caída abrupta en el valor de pH, debido a la proliferación de microorganismos en presencia de altas concentraciones de nutrientes. Los valores de pH registrados se mantuvieron relativamente constantes hasta el quinto día del proceso, después del cual se registró un descenso gradual del mismo hasta el día 12, estabilizándose hacia el fin de la fermentación. Por el contrario, en la fermentación con starter, el pH inició en un valor bajo (4,6), propio de la adición del sobrenadante de fermentación, registrándose luego un aumento de pH en los primeros dos días del proceso. Luego descendió gradualmente hasta los 20 días, con un valor final de 4,5, similar al observado al principio de la fermentación.

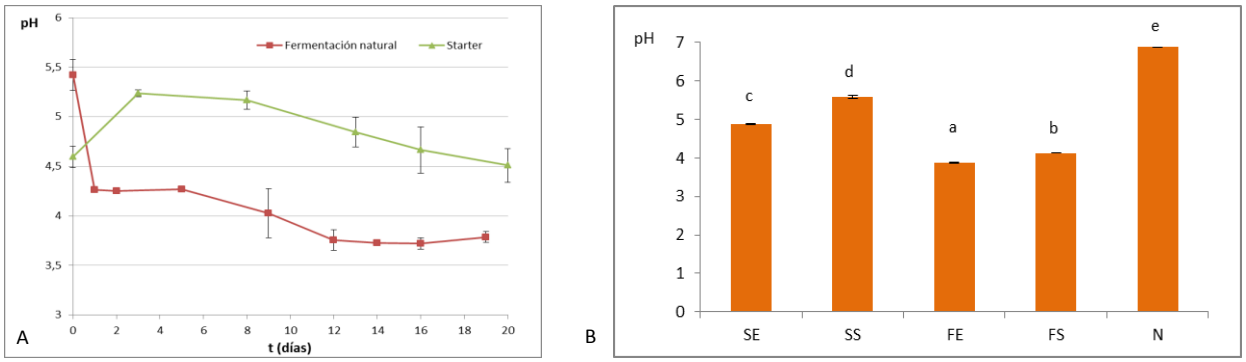


Figura 1. A) Cinéticas de pH de los sobrenadantes durante el proceso de fermentación natural y con starter. B) pH de los sobrenadantes de suspensiones de los almidones fermentados (SE, SS, FE y FS) y nativo (N)

En la **Figura 1B** se muestran los valores de pH obtenidos para suspensiones de los diferentes almidones fermentados y del almidón nativo. Se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en la acidez de almidones entre los diferentes tratamientos y todos resultaron más ácidos que el control de almidón nativo. Se observa que, dentro de un mismo proceso fermentativo, los almidones secados en estufa presentan mayor acidez que los secados al sol, en concordancia con lo informado por Dufour et al. (1996) donde se plantea que existe una reducción del contenido de ácido láctico por la exposición a la luz solar, probablemente debido a una reacción fotoquímica. En cuanto al proceso fermentativo, ambos almidones sometidos a fermentación natural resultaron más ácidos que los fermentados con starter, la misma tendencia que se observa para los pHs finales de los sobrenadantes de cada fermentación (**Fig. 1A**).

Los microorganismos que proliferan durante la fermentación producen ácidos orgánicos que pueden modificar los gránulos de almidón. Se ha informado que este efecto se asocia principalmente a la presencia de ácidos láctico, acético, butírico, propiónico, fórmico y succínico (Garcia et al. 2016). La observación microscópica de los gránulos demostró que los tratamientos afectaron la integridad de los mismos (**Figura 2**). Para ambos tipos de fermentación, se observó que el secado en estufa (FE y SE) produjo el colapso de la mayor parte de los gránulos (**Fig. 2A y 2B**, respectivamente). El almidón fermentado con starter y secado al sol (SS) presentó cierta destrucción de los gránulos (**Fig. 2D**), pero no tan evidente como en el secado en estufa. Por el contrario, los gránulos del almidón obtenido por fermentación natural y secado al sol (FS) no presentaron alteraciones (**Fig. 2C**), resultando similares al almidón nativo (**Fig. 2E**). La diferencia observada entre los almidones fermentados naturalmente (**Fig. 2A y C**) y con starter (**Fig. 2B y D**) puede deberse en parte a que estos últimos se encontraron en contacto con ácidos orgánicos desde el principio del proceso fermentativo.

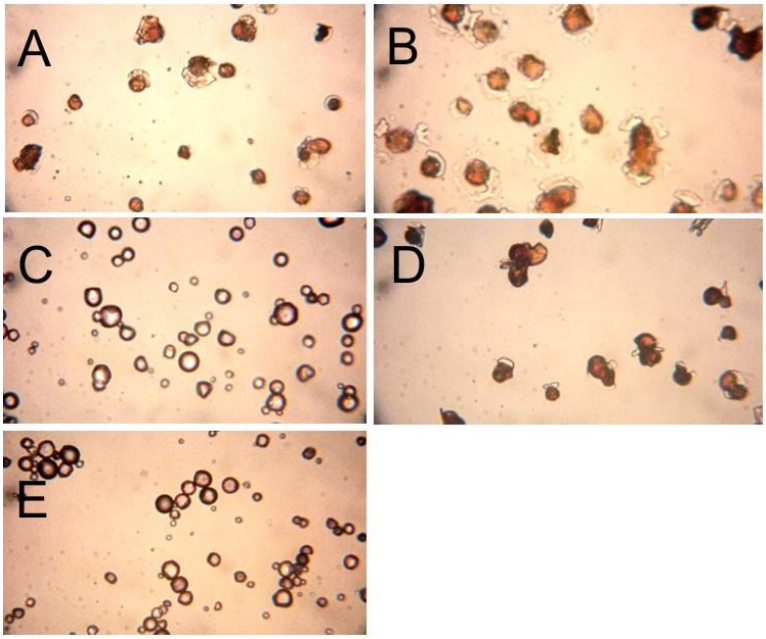


Figura 2. Tinción con lugol de los gránulos de almidón con diferentes tratamientos de fermentación y secado y sin tratar: A) FE, B) SE, C) FS, D) SS y E) Almidón nativo

En cuanto al color de los productos obtenidos, en la **Tabla 1** puede observarse que los almidones fermentados y luego secados al sol presentaron un valor de luminosidad significativamente más alto que el nativo, lo que indica una mayor blancura. En cuanto al parámetro a*, todos los almidones presentaron un valor menor que el del almidón nativo, la misma tendencia se observa para el parámetro b*, indicando que las diferentes fermentaciones reducen la leve tonalidad amarillenta del almidón nativo. Esto resultó particularmente evidente en el caso del FS, cuyo valor de b* fue el más bajo, en concordancia con el aumento significativo ($p<0.05$) observado para la luminosidad del mismo respecto del almidón nativo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Parámetros de color L, a* y b* de los almidones

	L	a*	b*
N	97,82±1 [a]	0,3±0,03 [d]	2,24±0,097 [c]
FE	98,35±0,64 [ab]	0,1±0,03 [b]	2 ±0,1 [b]
FS	98,8±0,45 [b]	0,24±0,01 [c]	1,47±0,08 [a]
SE	98,12±0,83 [ab]	0,08±0,02 [b]	2,02 ± 0,14 [b]
SS	98,36±0,18 [ab]	0,06±0,01 [a]	1,97 ± 0,04 [b]

Nota: Los valores informados corresponden a las medias ± la desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p<0,05).

En cuanto a las propiedades térmicas de los almidones obtenidos, por DSC se encontró que la fermentación disminuyó la temperatura de gelatinización, no observándose diferencias significativas entre los diferentes métodos de secado. Además, el almidón obtenido por fermentación con starter y secado en estufa presentó la menor temperatura de gelatinización, probablemente relacionado con el mayor daño observado en los gránulos. La alteración de la integridad granular se ve reflejada también en la menor temperatura de inicio del proceso (T_0). Sólo se observó un cambio significativo en la entalpía de gelatinización para el almidón fermentado secado en estufa (FE).

Tabla 2. Temperaturas de inicio y de pico (T_o y T_p) y entalpía de gelatinización (ΔH) de almidón de mandioca nativo y modificados físicamente

Almidón	T_o (ºC)	T_p (ºC)	ΔH (J/g, base seca)
Nativo	60,85 ± 0,5 [b]	68,5 ± 0,7 [c]	15 ± 1,0 [b]
FS	60,5 ± 0,9 [b]	66,8 ± 0,4 [b]	15,5 ± 0,5 [b]
FE	59,5 ± 0,7 [b]	66,9 ± 0,2 [b]	11,8 ± 0,7 [a]
SS	57,4 ± 0,4 [a]	66,1 ± 0,4 [ab]	15,07 ± 0,01 [b]
SE	57,3 ± 0,9 [a]	65,54 ± 0,08 [a]	14,2 ± 0,3 [b]

Nota: Los valores informados corresponden a las medias ± la desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p<0,05).

El comportamiento de flujo de las suspensiones de almidón se analizó utilizando el modo rotacional. Todas las pastas presentaron un comportamiento del tipo pseudoplástico, ya que la viscosidad y el esfuerzo de corte disminuyeron con el aumento de la velocidad de deformación. Un ejemplo del tipo de curva de esfuerzo en función de la velocidad de deformación se muestra en la **Figura 3**. Esto también se ve reflejado en los valores de n (índice de comportamiento de flujo) obtenidos, que resultaron menores a uno en todos los casos (**Tabla 3**).

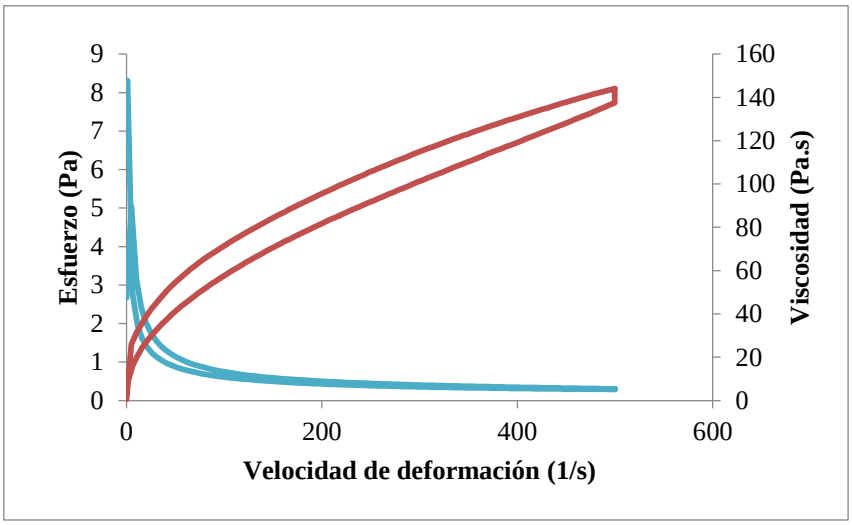


Figura 3. Ejemplo de curvas de flujo obtenidas mediante ensayos reológicos rotacionales. Curva celeste: Viscosidad vs. Velocidad de deformación. Curva roja: esfuerzo vs. Velocidad de deformación.

Tabla 3. Parámetros obtenidos del ensayo rotacional. Modelado de la curva.

	K	n	r	Tixotropía (Pa/s)	Viscosidad 500 s^{-1} (Pa s)
FS	5,1845±0,26 [b]	0,5282±0,0019 [a]	0,9992	6287,5±37,5 [a]	0,29±0,01 [b]
FE	5,3175±0,12 [b]	0,5387± 0,0003 [a]	0,9991	8717±625 [b]	0,319±0,007 [b]
SS	3,47± 0,87 [a]	0,5526±0,03 [a]	0,9993	7743,5±593 [b]	0,22±0,01 [a]
SE	6,582±0,15 [c]	0,5313± 0,0028 [a]	0,9991	15460±636 [c]	0,38±0,06 [c]
N	6,136±0,34 [bc]	0,5604±0,0022 [a]	0,9986	25905±346 [d]	0,43±0,02 [d]

Nota: Los valores informados corresponden a las medias ± la desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p<0,05).

En la **Tabla 3** también se observa que todas las pastas presentaron un valor de viscosidad aparente significativamente menor ($p<0,05$) a la del almidón nativo. Lo mismo ocurre con los valores de tixotropía. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta las alteraciones que se producen en los gránulos de almidón en mayor o menor grado por la fermentación microbiana. Además se ha informado que los ácidos orgánicos modifican el almidón e inducen en él diferentes efectos como su hidrólisis y entrecruzamientos, dependiendo del tipo y concentración de ácido orgánico (Reddy y Yang 2010, Kaur et al. 2012, Zhu 2015).
Para analizar el efecto de la retrogradación, se obtuvieron los barridos de frecuencia de las pastas almacenadas durante 72 h en condiciones de refrigeración (**Figura 4**). Se tomaron los valores de G' y G'' a 1 Hz, los resultados se muestran en las **Figuras 5** y **6**.

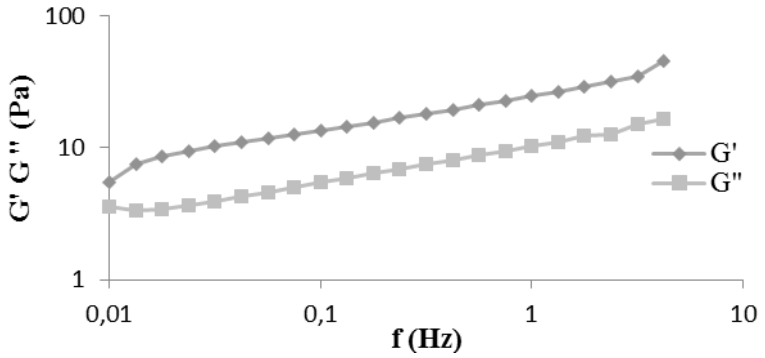


Figura 4. Ejemplo de espectro mecánico obtenido mediante los barridos de frecuencia.

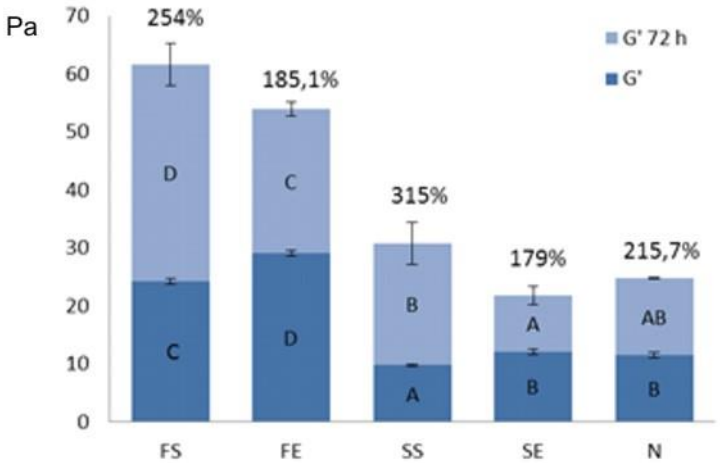


Figura 5. Efecto del almacenamiento refrigerado 4°C-72 h sobre el módulo elástico. Sobre cada columna se muestra el % de aumento de G'. Letras diferentes dentro de una serie de columnas del mismo color indican diferencias significativas.

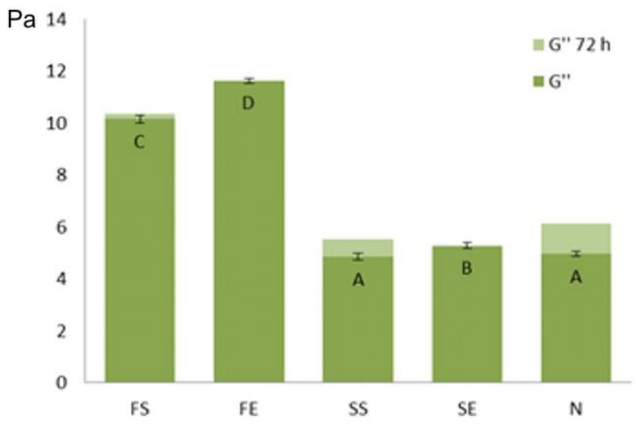


Figura 6. Efecto del almacenamiento refrigerado 4°C-72 h sobre el módulo viscoso. Letras diferentes dentro de una serie de columnas del mismo color indican diferencias significativas.

En todos los casos se observó que los valores de G' resultan mayores que los de G'', con una leve dependencia de la frecuencia, lo que indica que las pastas se comportan como geles débiles. Las pastas del almidón tratado con el starter y luego secado en estufa presentaron un valor de G' similar al que se obtuvo para el almidón nativo. La misma tendencia se observó en los ensayos rotacionales donde los parámetros de viscosidad aparente y tixotropía, si bien difieren significativamente del control, presentan valores cercanos a las pastas de almidón nativo (**Tabla 3**). Dado que los almidones SS y SE tienen una menor acidez que los fermentados, probablemente en estos casos la modificación del almidón durante la gelatinización por los ácidos orgánicos generados no sea tan relevante.
En cuanto a los resultados obtenidos luego de 72 h de refrigeración se observa que todas las pastas retrogradaron, esto se ve reflejado en el aumento de la componente elástica que es la más afectada por el fenómeno.

CONCLUSIONES

Los dos tipos de fermentación generaron perfiles de pH diferentes, lo que se vio reflejado en productos con características diferentes. En general ambas fermentaciones reducen la leve tonalidad amarillenta del almidón nativo.
La fermentación con starter indujo la mayor alteración en la morfología e integridad de los gránulos probablemente debido a la presencia de ácidos orgánicos desde el inicio del proceso. Estas alteraciones se reflejaron en la modificación de las temperaturas de inicio y de gelatinización de los almidones fermentados así como en el comportamiento reológico de las pastas obtenidas.
Ambos métodos de fermentación propuestos representan una alternativa económica y de fácil escalado que permite obtener productos con propiedades tecnológicas distintivas entre sí y diferentes a las del almidón nativo. El secado al sol, además de ser la opción más rentable, permite obtener los derivados con menor acidez siendo esta una característica sensorial relevante para su aplicación como ingrediente alimentario.

BIBLIOGRAFÍA

Dini C, Doporto MC, Viña SZ, García MA. 2014. Cassava flour and starch as differentiated ingredients for gluten free products. En: Molinari FP, editor. Cassava: Production, Nutritional Properties and Health Effects. 1ª ed. New York: Nova Science Publishers. pag. 87-114.
Dufour D, O'Brien GM, Best R. 1996. Cassava flour and starch: progress in research and development. 1ª ed. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. pag. 409.
Dufour D, Larsonneur S, Alarcón F, Brabet C, Chuzel G. 1996. Improving the bread-making potential of

cassava sour starch. En: Dufour D, O'Brien GM, Best R, editores. Cassava flour and starch : progress in research and development. Vol. 271. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. pag. 133-142.
Garcia MC, Franco CML, Júnior MSS, Caliari M. 2016. Structural characteristics and gelatinization properties of sour cassava starch. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 123(2): 919-926.
Kaur B, Ariffin F, Bhat R, Karim AA. 2012. Progress in starch modification in the last decade. Food Hydrocolloids, 26: 398-404.
Mestres C, Rouau X, Zakhia N, Brabet C. 1996. Physicochemical properties of cassava sour starch. En: Dufour D, O'Brien GM, Best R, editores. Cassava flour and starch: progress in research and development. Vol. 271. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. pag. 143-149.
Reddy N, Yang Y. 2010. Citric acid cross-linking of starch films. Food Chemistry, 118: 702–711.
Zhu F. 2015. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. Carbohydrate Polymers, 122: 456–480.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo fue realizado con la ayuda de los proyectos: PICT 2011-1213 y 2015-0921 (ANPCyT, Argentina) y del Proyecto de Vinculación Tecnológica PVT “Productos de la modificación de almidón de mandioca mediante procesos de bajo impacto ambiental para el agregado de valor y su aplicación como ingredientes alimentarios”.

Optimización de las condiciones de horneado de pan de molde fortificado

Erben M.[1,2], de la Torre M.A.[2], Osella C.A.[2]

(1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET.
(2) Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) – Facultad de Ingeniería Química (FIQ) – Universidad Nacional del Litoral. 1 de Mayo 3250, Santa Fe - Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

Se determinó la influencia de la temperatura (160-180-200ºC) y tiempo (20-25-30 min) de cocción en los parámetros de color y los niveles de lisina disponible (LD) en una formulación de pan de molde fortificado (88,8% harina de trigo, 8,2% harina de soja y 3% WPC 35). El color se evaluó a partir de la utilización de un espectrofotómetro y para el análisis de LD se empleó el método de Carpenter (1960) modificado por Booth (1971). Aumentos en la temperatura y tiempo de cocción produjeron un oscurecimiento a nivel de la corteza del pan, mientras que la miga fue menos susceptible a variar. Las condiciones de horneado presentaron, además, influencia significativa en el valor de LD (p<0,01). Aumentos en la temperatura y tiempo de horneado ocasionaron una reducción en el valor de la respuesta, que varió de 39,2 (160ºC-20 min) a 33,1 (200ºC-30 min) mg/g de proteína. Las condiciones de procesamiento óptimas se establecieron en 160ºC y 28 min. Se estudió el efecto del agua incorporada en la formulación, sin hallarse diferencias entre los tratamientos (p>0,05). Así, los parámetros optimizados permitieron obtener un pan con características de color deseables y un incremento del ~15 % en la disponibilidad de lisina.

Palabras clave: pan de molde, fortificación, condiciones de horneado, lisina disponible.

ABSTRACT

The influence of temperature (160-180-200ºC) and baking time (20-25-30 min) on color parameters and levels of available lysine (AL) of a fortified mold bread (88.8% wheat flour, 8.2% soy flour and 3% WPC 35) were determined. The color parameters were evaluated using a spectrophotometer and the method of Carpenter (1960) modified by Booth (1971) was used to quantified AL. Samples became dark at the crust related with baking temperature and time, while crumb was less susceptible to change. The influence of temperature and baking time was significative on AL values (p<0.01), a reduction from 39.2 (160°C-20 min) to 33.1 (200C-30 min) mg/g protein was caused by the increment of these variables. The optimum baking conditions were: 160°C-28 min. Water addition has not significant effect between treatments (p>0.05). Thus, optimized parameters allowed obtaining fortified bread with desirable characteristics of color and an increase of ~15% in the availability of lysine.

Keywords: mold bread, fortification, baking conditions, available lysine.

INTRODUCCIÓN

El pan es un alimento de consumo masivo por lo que el reemplazo de harina de trigo (HT) por harina de soja (HS), concentrado de proteínas del lactosuero (WPC), o sus mezclas, resulta una estrategia nutricional adecuada para mejorar la cantidad y calidad de las proteínas. No obstante, dado que la principal causa de deterioro en este nutriente está asociada a la reacción de Maillard, fundamentalmente por la pérdida de disponibilidad de lisina, el desafío resulta además tecnológico.

La reacción de Maillard se favorece en alimentos con alto contenido en proteína y carbohidratos e intermedio en humedad, temperaturas superiores a 50ºC y un pH entre 4 y 7. Además de cambios en el color y sabor, la reacción de Maillard puede generar más de 2500 compuestos aromáticos, que se relacionan con las características sensoriales de los alimentos procesados térmicamente, y que inciden de manera especial en la

aceptación del producto por parte del consumidor (Whitson et al. 2010, Cerny 2008), pero también genera cambios en las propiedades funcionales y el valor nutricional del producto. Trabajos publicados muestran que las reacciones de pardeamiento pueden tener un efecto adverso sobre la calidad nutricional de las proteínas de los alimentos, este efecto se debe al bloqueo de aminoácidos esenciales y en consecuencia, a una reducción en la disponibilidad biológica (Van Rooijen et al. 2013, Oh et al. 2013). La lisina es el aminoácido comúnmente más reactivo y su pérdida puede alcanzar un 50% (Delgado Andrade et al. 2007). Esto es importante en los alimentos en que la lisina es el aminoácido limitante, como sucede en los productos panificados (Meade et al. 2005). Los primeros estudios que han permitido conocer la influencia de las distintas condiciones de temperatura y tiempo de calentamiento sobre la reacción de Maillard se han realizado en sistemas modelo. De ellos se dedujo que la disminución de la lisina disponible (LD) y el aumento de compuestos de las etapas avanzadas son mayores con el incremento de la temperatura y el tiempo de exposición. Por estos motivos, el control de parámetros durante el horneado resulta crítico para la implementación exitosa de la tecnología de elaboración de panificados con harinas compuestas.
El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la temperatura (160-180-200ºC) y tiempo (20-25-30 min) de cocción, en los parámetros de color en corteza y miga y los niveles de lisina disponible en una formulación de pan de molde fortificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

En la elaboración de pan de molde se utilizó harina de trigo comercial 000 (HT) con las siguientes características: 13,6 g/100 g de humedad, 10,3 g/100 g (N x 5,7) de proteína, 1,0 g/100 g de grasa, 0,68 g/100 g de cenizas y 27,5 g/100 g de gluten húmedo; W (trabajo de deformación - 10^{-4} Joule): 305, P (tenacidad - mm): 110, P/L (relación tenacidad / extensibilidad): 1,2. Harina de soja desgrasada inactivada (HS) provista por Ricedal Alimentos S.A. (Santa Fe-Argentina) con un contenido de 7,5 g/100 g de humedad, 45,1 g/100 g (N x 6,25) de proteína, 1,3 g/100 g de grasa y 5,93 g/100 g de cenizas. Concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) provisto por Milkaut (Santa Fe-Argentina) con 6,7 g/100 g de humedad, 30,3 g/100g (N x 6,38) de proteína, 2,3 g/100 g de grasa y 6,3 g/100 g de cenizas. Además se emplearon otros ingredientes de grado alimentario: azúcar refinada comercial; sal fina comercial; oleomargarina PF 36ºC; polvo para hornear; leche en polvo descremada granulada de disolución instantánea y levadura prensada comercial.

Ensayo de panificación

Para la elaboración de pan de molde se utilizó el procedimiento propuesto por Tosi et al. (2002). La formulación empleada para el pan fortificado se describe a continuación: HT (266,5 g), HS (24,6), WPC (8,9), azúcar (18 g), levadura (15 g), grasa (9 g), leche en polvo (6 g), sal (6 g) y agua según absorción farinográfica (500 UB). La cocción se realizó en horno rotativo Zunino (ZU-95, Argentina). Luego de la cocción, los panes se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 60 minutos para su posterior evaluación.

Variables de proceso

Para la evaluación de variables de proceso se aplicó un diseño factorial completo con dos factores en tres niveles, con tres repeticiones en el punto central (11 corridas). Se analizó la influencia de la temperatura (160-180-200ºC) y tiempo (20-25-30 min) de cocción en los parámetros de color, en corteza y miga, y los niveles de LD. Posteriormente, utilizando las condiciones de proceso optimizadas, se determinó el efecto del nivel de agua en la formulación, a través de la elaboración de pan con ± 5% del nivel de agua necesario para alcanzar las 500 UB.

Parámetros de color

Las mediciones colorimétricas de cada muestra se realizaron utilizando un espectrofotómetro Minolta CM 508d (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan) con iluminante D65, ángulo de observación estándar 10° y componente especular excluido. Se evaluaron los parámetros correspondientes al sistema CIE: L*, a*, b*. El parámetro L* mide el grado de luminosidad (L*= 100: blanco; L*= 0: negro), el a*, el grado de componente

rojo o verde (a* > 0: rojo; a* < 0: verde) y el b* el grado de componente amarillo o azul (b* > 0: amarillo b* < 0: azul) (Hunterlab 2000). Los valores de croma ($C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$) y tono ($h_{ab}^*$ = arcotangente b*/a*; h = 0º: rojo; 90º amarillo; 180º: verde; 270º: azul) también fueron evaluados (Piagentini et al. 2012, Baixauli et al. 2008). Para la determinación de los parámetros de color en la corteza se tomaron dos panes y se efectuaron cinco mediciones por pan. Para evaluar el color en la miga se cortó una rodaja de 1 cm de espesor de cada pan y se realizaron cinco mediciones de color por rodaja. En todos los casos el valor informado correspondió al valor promedio obtenido.

Lisina Disponible

Para el análisis de la LD se utilizó el método de Carpenter (1960) modificado por Booth (1971), que involucra la reacción de Sanger.

Para ello se pesó una cantidad de muestra que correspondiera a 1,4 mg de nitrógeno, se agregaron 0,32 mL de NaHCO3 8% p/v, se homogeneizó y se incorporó 0,492 mL de solución de Flúor-2,4-dinitro-benceno (FDNB) (12 mL de etanol puro + 0,3 mL de FDNB, Sigma-Aldrich). Luego se agitó durante 2 horas al abrigo de la luz a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se dejó destapado y en oscuridad durante 24 horas para que se evapore el etanol. Luego se agregó de a poco 8 mL de HCl 8 N y se trató en autoclave durante 1 hora a 1 atmósfera. A continuación se filtró el hidrolizado y se enrasó a 10 mL con agua destilada. Luego se colocó 2 mL de cada muestra en 2 tubos diferentes (tubo A y B), los cuales se procesaron como se describe a continuación. Los tubos A se extrajeron 3 veces con 5 mL de éter sulfúrico (Cicarelli, Argentina), el éter sobrenadante se eliminó con pipeta, se evaporó en baño a 80ºC y se enrasó a 10 mL con HCl 1 N. . Los tubos B se extrajeron una vez con 5 mL de éter sulfúrico, se descartó el éter residual, se agregó NaOH 12 % p/v hasta neutralizar (pH=7), 2 mL de buffer carbonato (1 M, pH=8,5), 5 gotas de metilcloroformiato (Sigma-Aldrich), se agitó, se dejó reposar 8 minutos y se agregaron 0,75 mL de HCl concentrado. La solución obtenida se extrajo 4 veces con 5 mL de éter sulfúrico, se descartó el éter sobrenadante con pipeta, se evaporó el residual en baño a 80ºC,y se enrasó a 10 mL con agua destilada. Las muestras se midieron en espectrofotómetro UV-visible Milton Roy Genesys 5 (Ivyland, EEUU) a una longitud de onda de 435 nm. Las lecturas A-B es la absorbancia neta atribuible a la DFN-Lis. La curva de calibrado fue realizada con un patrón de EDNP-Lis-CIH Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) en el rango de 5 – 40 mg/L.

Análisis estadístico

Los valores medios, desvíos estándar y coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2010. El análisis de la varianza (ANOVA) fue aplicado para comparar medias al 95% de confianza, utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1. El diseño experimental y la optimización de las respuestas se llevó a cabo a partir de la utilización del software Design Expert 7.0.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las variables de proceso sobre los parámetros de color

Una primera evaluación del desarrollo de pardeamiento en la superficie del pan durante la cocción se realizó mediante inspección visual. La intensidad del color de las muestras aumentó con el tiempo de cocción, con una notable influencia de la temperatura utilizada. Los valores promedio obtenidos de las mediciones colorimétricas se presentan en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2** el resumen del análisis de varianza multifactorial.

El cambio de luminosidad en la corteza del pan fue modelado en función de los parámetros del tratamiento térmico a partir de una ecuación de primer orden que explicó el 98% de la variabilidad de los datos. Tanto la temperatura como el tiempo resultaron significativos, presentando el valor L* una relación lineal negativa que se tradujo, en el oscurecimiento de las muestras con el tiempo de cocción y el aumento en la temperatura del horno. Los panes presentaron un tono rojizo, indicativo del pardeamiento, sin embargo el modelo propuesto presentó falta de ajuste (p=0,0035), por lo que no fue posible modelar el cambio del parámetro a* de la corteza, en función de las variables analizadas. El componente amarillo se ajustó a un modelo lineal que explicó el 96% de la variabilidad de los datos, este parámetro presentó una relación lineal negativa con los factores analizados. Tanto la cromaticidad como el ángulo de tono presentaron una relación inversamente proporcional con las variables estudiadas, ambos modelos pudieron ajustarse y explicaron el 94% de la variabilidad de C_{ab}* y el 98% de la variabilidad de los datos de h_{ab}*.

Como se observa en la **tabla 1**, cuando se analizaron los parámetros de color en la miga, sólo los modelos obtenidos para los parámetros L* y h_{ab}* resultaron significativos. Estos modelos lograron explicar el 62 y 60% en la variabilidad de los datos respectivamente y en ambos casos, de acuerdo al análisis de varianza aplicado, sólo el factor temperatura resultó ser estadísticamente significativo. Ha sido demostrado que la medición instrumental del color en productos horneados es un parámetro de control de calidad que puede ser utilizado para determinar los efectos de los ingredientes de la formulación, variables de proceso, así como

también de las condiciones de almacenamiento en productos horneados (Erkan et al. 2006, Gallagher et al. 2003a, Gallagher et al. 2003b, Sánchez et al. 1995). Sin embargo, dado que el efecto de la formulación no fue analizado en el presente estudio, las características de color de la miga resultaron menos susceptibles a variar de manera significativa.

Tabla 1. Parámetros instrumentales de color

Factores		Respuestas									
T	t	Corteza					Miga				
		L^*	a^*	b^*	C_{ab}^*	h_{ab}^*	L^*	a^*	b^*	C_{ab}^*	h_{ab}^*
160	20	56,2±1,1	17,2±0,4	35,4±0.7	39,4±0,8	64,1±0,4	67,9±1,6	1,4±0,4	17,8±1,1	17,8±1,2	85,5±0,9
180	20	48,8±3,0	18,7±0,2	31,7±2,2	36,8±1,9	59,4±1,9	63,8±2,3	1,4±0,2	17,4±0,8	17,5±0,8	85,3±0,7
200	20	40,6±1,0	16,7±0,6	22,7±1,2	28,2±1,3	53,6±0,8	63,4±2,6	1,5±0,4	17,0±1,8	17,0±1,8	85,0±1,1
160	25	51,8±1,3	17,6±0,3	32,8±0,4	37,2±0,4	61,8±0,4	65,5±2,0	1,4±0,3	17,1±0,9	17,1±0,9	85,4±0,9
180	25	45,8±1,0	18,0±0,1	29,0±0,7	34,2±0,5	58,2±0,7	65,8±2,1	1,4±0,3	17,1±1,3	17,2±1,3	85,4±0,7
200	25	36,6±0,9	15,7±0,5	19,4±0,6	25,0±0,7	51,1±0,7	63,3±2,9	1,7±0,2	18,0±0,9	18,0±0,9	84,6±0,6
160	30	48,9±1,9	18,1±0,3	31,4±1,1	36,2±1,1	60,0±0,5	67,1±1,6	1,4±0,4	17,6±1,4	17,7±1,4	85,4±1,0
180	30	43,2±0,8	17,6±0,2	25,9±0,5	31,3±0,5	55,7±0,4	63,7±2,6	1,3±0,4	16,4±1,1	16,4±1,1	85,5±1,1
200	30	36,9±0,7	16,0±0,4	19,5±0,6	25,3±0,7	50,6±0,6	64,6±1,5	1,5±0,3	17,4±0,9	17,5±0,9	85,0±0,8
180	25	43,9±1,1	17,9±0,2	27,6±0,7	32,9±0,6	57,0±0,6	65,2±1,7	1,5±0,3	17,6±1,1	17,7±1,1	85,1±0,8
180	25	45,0±1,2	17,9±0,2	28,2±1,1	33,4±1,0	57,5±0,8	64,9±2,4	1,6±0,4	18,0±1,3	18,1±1,3	84,9±0,9

T: temperatura (ºC), t: tiempo (min), Media ± Desvío estándar.

Tabla 2. Análisis de varianza: parámetros instrumentales de color

Fuente de variación	g.l.	Valor *p*									
		Corteza					Miga				
		L^*	a^*	b^*	C_{ab}^*	h_{ab}^*	L^*	a^*	b^*	C_{ab}^*	h_{ab}^*
Modelo	2	<0,0001	0,1190	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0204	0,1761	0,8472	0,8535	0,0280
T (ºC)	1	<0,0001	0,0483	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0067	0,0726	0,8921	0,9197	0,0094
T (min)	1	<0,0001	0,6642	0,0027	0,0078	0,0001	0,9023	0,7882	0,5877	0,5915	0,9416
Falta de ajuste	6	0,5979	0,0035	0,2318	0,1567	0,5361	0,1539	0,7049	0,4669	0,4731	0,7296
R^2		98%	41%	96%	94%	98%	62%	35%	4%	4%	60%

Efecto de las variables de proceso sobre los niveles de LD

Es evidente que parte de la lisina se pierde durante la cocción del pan. En este caso, el contenido de LD varió

de 39,2±0,1 (160ºC-20 min) a 33,1±0,7 (200ºC-30 min) mg/g de proteína, lo que puede traducirse en una disminución de disponibilidad de lisina en pan de molde del ~15%, según las condiciones de horneado empleadas.

La respuesta LD ajustó a un modelo cuadrático que explicó el 97% de la variabilidad de los datos. Los componentes lineales de ambos factores analizados presentaron una influencia altamente significativa (p<0,01), así como también el término cuadrático del factor temperatura (p=0,003). Por el contrario, la interacción y el componente cuadrático del tiempo no afectaron la respuesta (p>0,05). Como se aprecia en la superficie de respuesta de la Figura 1, aumentos en la temperatura y el tiempo de horneado causaron una reducción del contenido de LD por gramo de muestra.

Considerables daños han sido informados en productos a base de cereales tratados térmicamente como panes, galletas, pastas y cereales para desayuno. Ramírez Jiménez et al. (2001) al evaluar el efecto del tiempo de tostado en la disponibilidad de lisina de rodajas de pan, hallaron pérdidas cercanas al 40% en relación al pan sin tostar. Lindenmeier y Hofmann (2004), demostraron que la concentración del compuesto antioxidante pronil-lisina en productos horneados, está fuertemente asociada a los ingredientes utilizados en la formulación y las condiciones de proceso empleadas; este compuesto, que resulta de la reacción entre lisina y acetilformoína, fue hallado en grandes cantidades en la corteza del pan y su concentración aumentó en más de un 200%, al sustituir un 5% de la harina de trigo (HT) por una proteína rica en lisina como la caseína, o a través de la adición de glucosa en la formulación. Recientemente, en un estudio llevado a cabo por Helou et al. (2015), se estableció que el contenido de lisina en la miga de pan se mantiene relativamente estable en el tiempo (319±17,9 mg de lisina/100 g de materia seca); mientras que, en la corteza, luego de una aparente estabilidad, la pérdida de lisina exhibe una cinética de degradación de segundo orden, siendo al final de la cocción la pérdida media del 56%. La aparente estabilidad observada en los niveles de lisina durante los primeros minutos de cocción ha sido descrita anteriormente como un período durante el cual la lisina es al mismo tiempo involucrada en la formación de los productos de la reacción de Maillard y "reciclada", después de la degradación del producto Amadori (Van Boekel 2001).

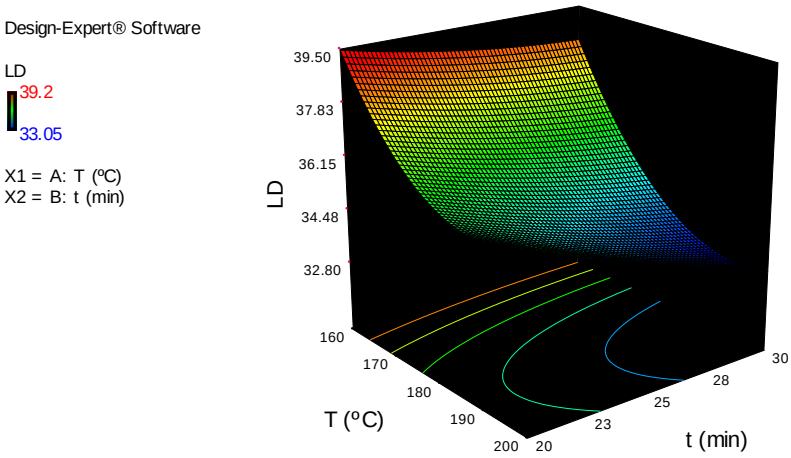


Figura 1. Superficie de respuesta para nivel de LD en pan de molde

Teniendo en cuenta antecedentes de correlación entre el contenido de LD y el índice de amarronamiento en harinas y aislados de proteínas sometidos a tratamiento térmico (Rhee y Rhee 1981), y con la necesidad de determinar la utilidad de los parámetros de color en predecir la pérdida de lisina como consecuencia de Maillard, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los niveles de LD y los diferentes parámetros de color analizados en la corteza de pan de molde. Los parámetros L^*, b^*, C_{ab}^* y h_{ab}^* presentaron una correlación positiva significativa (p<0,05) con la LD, indicando que cambios en estos parámetros

repercutirán en forma directamente proporcional en los valores de disponibilidad del aminoácido.

Optimización del diseño experimental

Para la optimización del diseño se tuvieron en cuenta los datos de color en la corteza del pan y los niveles de LD. Los valores de color en la miga no fueron utilizados debido a que no se hallaron modelos matemáticos con peso estadístico que ajustaran su variabilidad. Para determinar las condiciones óptimas de tiempo y temperatura de horneado, se seleccionaron los criterios e impactos para cada una de las respuestas. Los criterios utilizados para los parámetros de color se establecieron en base a un pan testigo (100% HT) con límites establecidos mediante inspección visual, de manera tal que el pan quede ni muy oscuro ni excesivamente claro. En la **Tabla 3** se presentan los valores mínimos y máximos obtenidos del diseño experimental y los criterios utilizados en la función de deseabilidad para la optimización. Se decidió otorgar mayor impacto a la respuesta LD por ser un parámetro determinante de la calidad nutricional del producto.

Las condiciones de procesamiento que permitieron obtener un pan con características de color deseables y máxima concentración de LD correspondieron a una temperatura de 160ºC y un tiempo de horneado de 28 minutos.

Los modelos hallados fueron validados comparando las respuestas predichas con datos experimentales, hallándose dentro del intervalo de confianza correspondiente, para cada una de las variables analizadas (**Tabla 4**).

Tabla 3. Valores observados y criterios utilizados en la función de deseabilidad para la optimización múltiple del diseño experimental

Respuesta	Mínimo observado	Máximo observado	Objetivo	Impacto
Parámetros de color				
L*	36,6±0,9	56,2±1,1	50 – 55	3
a*	15,7±0,5	18,7±0,2	15 – 18	3
b*	19,4±0,6	35,4±0,7	30 – 35	3
C_{ab}*	25,0±0,7	39,4±0,8	35 – 40	3
h_{ab}*	50,6±0,6	64,1±0,4	60 – 65	3
LD (mg/g prot)	33,1±0,7	39,2±0,1	Maximizar	5

Tabla 4. Validación de los modelos. Valores experimentales y predichos por el diseño experimental

Respuesta	Valor experimental	Valor predicho	Intervalo de confianza (95 %)	Error (%)*
Parámetros de color				
L^*	50,6±1,2	50,0	48,9 – 51,1	1,10
a^*	17,8±0,3	18,0	17,1 – 19,0	1,00
b^*	32,1±0,7	32,1	30,6 – 33,6	0,06
C_{ab}^*	36,8±1,1	36,8	35,1 – 38,4	0,11
h_{ab}^*	61,6±0,9	60,8	60,0 – 61,6	0,66
LD	37,7±0,4	37,9	37,0 – 38,8	0,66

* *[(Valor experimental – Valor predicho)*100/Valor predicho]*.

Efecto del nivel de agua en la formulación

Nuevamente, se elaboró el pan con las condiciones de procesamiento optimizadas, variando en este caso la cantidad de agua adicionada a la formulación en ± 5% de nivel necesario para alcanzar las 500 UB. Las respuestas analizadas fueron los parámetros de color en la corteza y los niveles de LD. El análisis de varianza fue aplicado sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para las respuestas evaluadas (p>0,05), por lo que los parámetros de color y los niveles de LD en el pan de molde no fueron modificados por los niveles de agua empleados en la formulación.

Pérez et al. (2013) al evaluar galletitas dulces fortificadas con HS y WPC, hallaron una correlación negativa

entre el contenido de agua y la pérdida de LD, indicando que un aumento en la cantidad de agua incorporada a la formulación presenta un efecto claramente beneficioso sobre la retención de lisina, al producir un retraso en el desarrollo de la reacción de Maillard. Este efecto no fue hallado en el presente trabajo, debido posiblemente a la diferencia en la matriz evaluada y al hecho de que en el estudio realizado por Pérez et al. (2013) los niveles de agua de la formulación fueron variados en más de un 30%, cantidades que no pueden ser estudiadas en pan debido a los inconvenientes tecnológicos que se ocasionarían.

CONCLUSIONES

Las condiciones de proceso empleadas en la elaboración de pan de molde demostraron influencia en los parámetros físicos, presentando además una implicancia nutricional en el producto desarrollado. La retención de lisina resultó altamente dependiente de la temperatura y el tiempo de cocción, presentando los valores de disponibilidad del aminoácido una relación inversamente proporcional con estas variables, las cuales modificaron hasta un 15% los valores de disponibilidad de éste aminoácido esencial. De esta manera, se puede concluir que la determinación de LD es un parámetro útil para predecir el deterioro del valor nutricional asociado a proteínas durante la cocción. Los resultados expuestos, destacan la importancia de seleccionar cuidadosamente no sólo los ingredientes utilizados sino también las condiciones de elaboración, de manera de garantizar un adecuado valor nutricional del producto. Por último, los parámetros L^*, b^*, C_{ab}^* y h_{ab}^* de la corteza del pan podrían ser utilizados *a priori* como indicadores de calentamiento excesivo y de la reducción en la disponibilidad de lisina, debido a la asociación significativa hallada entre éstos y el aminoácido esencial.

BIBLIOGRAFÍA

Baixauli R, Salvador A, Fiszman SM. 2008. Textural and color changes during storage and sensory shelf life of muffins containing resistant starch. European Food Research and Technology. 226: 523-530.

Booth VH. 1971. Problems in the determination of FDNB-available lysine. Journal of the Science of Food and Agriculture, 22: 658-666.

Carpenter KJ. 1960. The estimation of available lysine in animal protein foods. Biochemical Journal, 77: 604-610.

Cerny C. 2008. The aroma side of the Maillard reaction. Annals of the New York Academy of Sciences, 1126: 66-71.

Delgado Andrade C, Rufián Henares JA, Morales FJ. 2007. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. Food Chemistry, 100: 725-731.

Erkan H, Celik S, Bilgi B, Koskel H. 2006. A new approach for the utilization of barley in food products: barley tarhana. Food Chemistry, 97: 12-18.

Gallagher E, Gormley TR, Arendt EK. 2003a. Crust and crumb characteristics of gluten free breads. Journal of Food Engineering, 56: 153-163.

Gallagher E, Kunkel A, Gormley TR, Arendt EK. 2003b. The effect of dairy powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. European Food Research and Technology, 21: 44-48.

Helou C, Jacolot P, Niquet Léridon C, Gadonna Widehem P, Tessier FJ. 2015. Maillard reaction products in bread: A novel semi-quantitative method for evaluating melanoidins in bread. Food Chemistry, 190: 904-911.

Hunter L*a*b*. 2000. Universal Software Versión 4.0 and Above User's Manual. Hunter Associates Laboratory. Virgina, United States.

Lindenmeier M, Hofmann T. 2004. Influence of baking conditions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-L-lysine in bakery products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 350-354.

Meade SJ, Reid EA, Gerrard JA. 2005. The impact of processing on the nutritional quality of food proteins.

Journal of AOAC International, 88: 904-922.
Oh NS, Lee HA, Lee JY, Joung JY, Lee KB, Kim Y, Kim SH. 2013. The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins. Journal of Dairy Science, 96: 4899-4911.
Pérez SR, Matta E, Osella CA, de la Torre MA, Sánchez HD. 2013. Effect of soy flour and whey protein concentrate on cookie color. LWT- Food Science and Technology, 50: 120-125.
Piagentini AM, Martín L, Bernardi C, Güemes DR, Pirovani ME. 2012. Color changes in fresh-cut fruits as affected by cultivar, chemical treatment, and storage time and temperature. Color in food: Technological and psychophysical aspects. 1ª Ed. New York, United States: CRC Press.
Ramírez Jiménez A, García Villanova B, Guerra Hernández E. 2001. Effect of toasting time on the browning of sliced bread. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 513-518.
Rhee KS, Rhee KC. 1981. Nutritional evaluation of the protein in oilseed products heated with sugars. Journal of Food Science, 46: 164-168.
Sánchez C, Klopfenstein CF, Walker CE. 1995. Use of carbohydrate fat substitute and emulsifying agents in reduced-fat shortbread cookies. Cereal Chemistry, 72: 25-29.
Tosi EA, Ciappini MC, Masciarelli R, Re E. 1994. Uso de harina integral de amaranto y harina de trigo en la fabricación de galletitas. Alimentaria. 258: 51-53.
Van Boekel MAJS. 2001. Reviews kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review. Nahrung, 45: 150-159.
Van Rooijen C, Bosch G, Van der Poel AF, Wierenga PA, Alexander L, Hendriks WH. 2013. The Maillard reaction and pet food processing: effects on nutritive value and pet health. Nutrition Research Reviews, 26: 130-148.
Whitson ME, Miracle RE, Drake MA. 2010. Sensory characterization of chemical components responsible for cardboard flavor in whey protein. Journal of Sensory Studies, 25: 616-636.

Caracterización de fibra dietaria aislada a partir de residuos (hojas, tallos, cáscara y rizomas) de remolacha roja

Erhardt E.[1], Rojas A.M.[1,2], Gerschenson L.[1,2], Fissore E.[1,2]

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
(2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)
eliana@di.fcen.uba.ar

RESUMEN
El consumo promedio de fibra dietaria en Argentina es mucho menor al recomendado por la Organización Mundial de la Salud. La pectina es un tipo de fibra dietaria soluble fermentable que, además de poseer múltiples beneficios para la salud, tiene aplicaciones como aditivo en la industria alimentaria. A nivel industrial, se obtiene tratando los residuos de cítricos o de manzana con ácido mineral diluido, generando grandes cantidades de efluentes que necesitan tratamiento. Los métodos enzimáticos para aislar pectina son una alternativa amigable con el ambiente. Por otro lado, el creciente consumo de vegetales frescos, pelados y cortados genera una gran cantidad de residuos que suelen ser descartados pero podrían ser utilizados para la obtención de pectina, ayudando a reducir la polución y a recuperar biomasa y nutrientes. En este trabajo, se aislaron y caracterizaron fracciones de fibra dietaria soluble de residuos de *Beta vulgaris* var. *conditiva* (hojas, tallos, cáscaras y rizomas). Se ensayaron dos pre-tratamientos distintos: uno con carbonato de sodio y otro con hidróxido de sodio. El producto obtenido fue sometido a digestión con celulasa o hemicelulasa para obtener fracciones enriquecidas en pectina. El mayor rendimiento se logró con el tratamiento de hidróxido de sodio seguido por celulasa.

Palabras clave: residuos de *Beta vulgaris*, enzimas, pectina.

ABSTRACT
Average dietary fiber consumption in Argentina is much lower than the World Health Organization fiber recommended intake. Pectin is a fermentable soluble dietary fiber which besides possessing multiple health benefits, has applications in the food industry as an additive. In the industry, pectin is extracted by treating citrus and apple residues with dilute mineral acid, generating large amounts of effluents in need of treatment. Enzymatic methods of pectin isolation are an environmentally friendly alternative to acidic methods usually used. On the other hand, the increased consumption of fresh cut and peeled products generates a huge amount of wastes that are usually discarded but could be used for obtaining pectin helping to reduce pollution and restore biomass and nutrients. In this research, we isolated and characterized soluble dietary fiber from *Beta vulgaris* var. *conditiva* wastes (leaves, stems, rhizomes and peels). Two different pre-treatments were assayed: one with sodium carbonate and another one with sodium hydroxide. The product obtained was subjected to enzymatic digestion with cellulase or hemicellulase to obtain pectin enriched fractions. The highest yield was achieved for the sodium hydroxide treatment followed by hydrolysis with cellulase.

Key words: *Beta vulgaris* residues, enzymes, pectin.

INTRODUCCIÓN

Según el Codex Alimentarius (Miller Jones 2014), se define a la fibra dietaria como los polímeros de hidratos de carbono con diez o más unidades monoméricas que no son digeridos ni absorbidos por las enzimas endógenas del intestino delgado humano y que se encuentran naturalmente en los alimentos, o que son obtenidos de materia prima alimentaria, o aquellos de origen sintético, que tengan un efecto fisiológico

beneficioso para la salud. La fibra dietaria, si es de origen vegetal, puede incluir fracciones de lignina y/u otros compuestos asociados con los polisacáridos en la pared celular vegetal. Según su solubilidad en agua, la fibra dietaria puede clasificarse en fibra dietaria insoluble, que incluye celulosas, algunas hemicelulosas y lignina, y fibra dietaria soluble, que incluye pectinas, β-glucanos, gomas, mucílagos y algunas hemicelulosas. Aproximadamente, un 75% de la fibra en los alimentos es, en general, fibra insoluble (Matos-Chamorro y Chambilla-Mamani 2010).

La cantidad de fibra que se consume varía geográficamente. En países industrializados como los EE.UU., el consumo promedio es de 12-15 g/día, mucho menor que el consumo de 25-40 g/día que recomienda la Organización Mundial de la Salud (Jalili et al. 2007). Por otro lado, algunas comunidades africanas consumen hasta 50 g de fibra por día (Jalili et al. 2007). Según Meisner et al. (2011), el consumo promedio de fibra dietaria en la Argentina es de 15,30 g/día, siendo 10,26 g/día fibra insoluble y 5,04 g/día fibra soluble. De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (CAA 2016), para que se considere que los alimentos contienen fibra dietaria deben tener una cantidad mayor o igual a 0,5 g por porción; para ser buena fuente de fibra deben tener al menos 3 g/100g o 1,5 g/100ml y, al menos, 6 g/100g o 3 g/100ml para ser excelentes fuentes. Estudios epidemiológicos avalados por investigaciones en laboratorios le han atribuido un efecto beneficioso para la salud a la fibra dietaria o a su absorción en un amplio rango de enfermedades o afecciones que incluyen apendicitis, arteriosclerosis, cáncer colorrectal, constipación, diabetes, enfermedad diverticular, litiasis biliar, úlcera gástrica y duodenal, hernia de hiato, enfermedades cardiovasculares, hemorroides, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), síndrome del colon irritable, obesidad, cálculos renales, várices y enfermedades virales (Chesson 2006).

Las sustancias pécticas son una familia de polisacáridos de la pared celular. Yapo (2011) propuso un modelo estructural para la pectina que comprende 17 monosacáridos distintos, siendo el ácido galacturónico el más abundante, seguido por la galactosa y la arabinosa. El contenido de pectina y la composición de las sustancias pécticas son diferentes entre las distintas plantas, variedades de plantas, tejidos vegetales y la etapa del desarrollo de la planta (Lopes da Silva y Rao 2006). Su utilidad como aditivos alimentarios se debe principalmente a que poseen una gran capacidad de retención de agua (Jalili et al. 2007) y pueden gelar bajo determinadas condiciones. Sus principales usos son como agentes gelantes, espesantes y estabilizantes (Lopes da Silva y Rao 2006). La composición, estructura y propiedades fisiológicas de las pectinas están influenciadas por las condiciones de extracción y por la fuente, entre otros factores. Comercialmente la pectina se extrae tratando al material vegetal crudo con ácido mineral diluido a pH 1 – 3, en caliente a 70 – 90°C en un proceso que puede durar entre 3 y 12 hs (Brejnholt 2010). Los efluentes se han vuelto una importante consideración en la industria de las pectinas; de hecho, los problemas por efluentes han causado el cierre de varias plantas (May 1990). Una alternativa es el uso de enzimas que degraden la pared celular para liberar los polisacáridos pécticos (Endress et al. 2005).

Existe un gran interés en el uso de los residuos de la industrialización de tejidos vegetales con el fin de minimizar los problemas ambientales que podrían generar y de convertir dicha biomasa en productos de valor agregado. Por ejemplo, la pulpa de remolacha azucarera, los residuos de la industrialización de girasol y la pulpa de la oliva, han sido estudiados como fuentes alternativas de pectina (Lopes da Silva y Rao 2006).

Las remolachas son miembros de la familia *Chenopodiaceae*. A diferencia de la mayoría de las dicotiledóneas, las *Chenopodiaceae* tienen significantes niveles de ácido ferúlico en sus paredes primarias (Marry et al. 2000). Se utilizan en la industria y también para consumo doméstico. Los subproductos de su industrialización se utilizan ya sea para alimento de animales o se disponen como desechos industriales. La mayoría de la investigación sobre pectina de remolacha se ha realizado sobre la variedad azucarera y utilizando el subproducto de la extracción de azúcar. *Beta vulgaris* L. var. *conditiva* o remolacha roja se utiliza mayormente para ensaladas o purés, frescas o cocidas, y también para extraer un pigmento natural que confiere su color rojo (Nayak et al. 2006).

El objetivo del presente trabajo fue utilizar las enzimas hemicelulasa y celulasa para aislar fibra dietaria soluble a partir de residuos (hojas, tallos, cáscara y rizomas) de remolacha roja, *Beta vulgaris* var. *conditiva*, y caracterizar químicamente la fibra obtenida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las remolachas rojas, *Beta vulgaris* var *conditiva*, fueron lavadas cuidadosamente y se simularon los residuos industriales descartando la parte comestible de la raíz y conservando las hojas, tallos, cáscaras y rizomas, que se secaron en una estufa de convección a 80ºC. El material de pared celular (CWM) en polvo resultante fue molido (420 – 740 micrones) y, de acuerdo al método descripto por Martin-Cabrejas et al. (1994), fue sometido a tratamientos consecutivos con etanol 80% en ebullición, para obtener el residuo insoluble en alcohol (AIR).

Aislamiento de las fracciones enriquecidas en pectina

Considerando que el tejido de remolacha roja contiene ácido ferúlico unido a la pectina a través de los residuos de arabinosa (Waldron et al. 1997), se ensayaron 2 pre-tratamientos previos a la digestión enzimática, para romper los enlaces con ácido ferúlico y poder aislar mayores cantidades de pectina:

- carbonato de sodio: 2,5g de AIR en 125 ml de Na_2CO_3 0,05M incubados durante 30 min a temperatura ambiente y con agitación constante.
- hidróxido de sodio: 2,5g de AIR en 125 ml de NaOH 2M incubados durante 30 min a temperatura ambiente y con agitación constante.

Los sistemas fueron filtrados y los sobrenadantes descartados. Los productos obtenidos se sometieron a las siguientes digestiones (5 hs, 40ºC):

- Con hemicelulasa (H): 10g AIR con 0,25 g de hemicelulasa (H2125, Sigma, EE.UU) en 1000 ml de buffer citrato de sodio 0,05M (pH 5,2).
- Con celulasa (C): 10g AIR con 0,05 g de celulasa (H2125, Sigma, EE.UU) en 1000 ml de buffer citrato de sodio 0,05M (pH 5,2).
- Sin enzimas (SE): 10g en 1000 ml de buffer citrato de sodio 0,05M (pH 5,2).

Luego de las digestiones, los residuos se separaron de los sobrenadantes por filtración con vacío. Los polisacáridos disueltos en los sobrenadantes fueron precipitados con etanol 96 % (v/v) y separados mediante filtración al vacío con fibra de vidrio, congelados en freezer (-18 ºC), liofilizados, molidos con un molinillo de uso doméstico (Connoísserve, China) y conservados en freezer a -18ºC. .

De acuerdo a lo antedicho, las fracciones aisladas se nombraron:

- CO-SE: Con pre-tratamiento carbonato y sin tratamiento enzimático.
- CO-H: Con pre-tratamiento carbonato y con tratamiento con hemicelulasa.
- CO-C: Con pre-tratamiento carbonato y con tratamiento con celulasa.
- B-SE: Con pre-tratamiento básico y sin tratamiento enzimático.
- B-H: Con pre-tratamiento básico y con tratamiento con hemicelulasa.
- B-C: Con pre-tratamiento básico y con tratamiento con celulasa.

Análisis químicos

Se determinó el contenido de carbohidratos totales (Dubois et al. 1956), ácidos urónicos (Filisetti-Cozzi y Carpita 1991), almidón (AACC 2000), proteínas (Lowry et al. 1951), polifenoles totales (Singleton y Rossi 1965), metanol (Wood y Siddiqui 1971) y grupos acetilo (Naumenko y Phillipov 1992).

El grado de metilación fue calculado como el porcentaje entre los moles de metanol y moles de ácidos urónicos por 100 g de muestra. El grado de acetilación fue calculado como el porcentaje entre los moles de grupos acetilos y moles de ácidos urónicos por 100 g de muestra.

Todos los métodos fueron realizados utilizando agua deionizada (Milli-Q®). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los ajustes de los datos experimentaes fueron evaluados mediante el software Prism6 Statistical Software para Windows (GraphPad, USA). Los análisis estadísticos para comparar los resultados fueron realizados por medio del análisis de varianza ANOVA (nivel de significancia 0,05) y con el test post-hoc de Tukey (Sokal et al. 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimientos

Los rendimientos de las fracciones enriquecidas en pectina fueron menores a 1 g /100g AIR para las fracciones aisladas con el pre-tratamiento de carbonato; mientras que, para las aisladas con el pre-tratamiento con hidróxido de sodio, el rendimiento fue entre 26 - 45 g/100g AIR (**Tabla 1**).

Las pectinas pueden estar unidas a ácido ferúlico y p-cumárico a través de enlaces éster en los residuos terminales de sus cadenas laterales, siendo el primero el más abundante, pudiendo sufrir dimerización y formar diferulatos que entrecruzan los polímeros pécticos (Fry 1986). Waldron et al. (1997) informaron la presencia de diferulatos en polisacáridos pécticos de remolacha roja. Los bajos rendimientos obtenidos en las fracciones aisladas con pre-tratamiento de carbonato de sodio (Tabla 1) pueden ser atribuidos a la presencia de diferulatos en el AIR. Dicho pre-tratamiento no resultó adecuado para obtener una extracción eficiente de fracciones enriquecidas en pectina por no haber producido una hidrólisis eficiente de los diferulatos. Por el contrario, el pre-tratamiento básico realizado logró saponificar los diferulatos presentes y así obtener altos rendimientos (**Tabla 1**) para las tres fracciones aisladas (26 a 45 g/100g AIR).

Tabla 1. Rendimientos de las fracciones enriquecidas en pectina aisladas de AIR de residuos de *Beta vulgaris* con pretratamiento con carbonato de sodio (CO) ó con hidróxido de sodio (B), seguido por digestión enzimática con hemicelulasa (H), celulasa (C) o sin enzima (SE).

Fracción	Rendimiento (g/100g AIR)
CO-SE	0,33
CO-H	0,42
CO-C	0,04
B-SE	26,17
B-H	29,85
B-C	44,83

Fissore et al. (2009) aislaron fracciones enriquecidas en pectina a partir de calabaza utilizando 0,25 g de hemicelulasa en 10 g de CWM y 0,05 g de celulasa en 10 g de CWM y obtuvieron rendimientos de 4,70 g/100g CWM y 6,12 g/100g CWM respectivamente; Fissore et al (2011) también aislaron fracciones enriquecidas en pectina a partir de mesocarpio de raíz de remolacha utilizando un pre-tratamiento básico y una posterior digestión enzimática a 30ºC durante 20 hs con 0,75 g de hemicelulasa cada 10 g de CWM ó 0,15 g de celulasa cada 10 g de CWM. Los rendimientos obtenidos fueron de 8,2 g /100g CWM para la fracción aislada con hemicelulasa y 15,2 g /100g CWM para aquella aislada con celulasa, siendo estos valores comparables a los obtenidos en el presente trabajo en distintas condiciones de temperatura y tiempo. Nawirska y Kwasniewska (2005) aislaron fracciones enriquecidas en pectina a partir de residuos de pulpa de manzana, pera y zanahoria y obtuvieron rendimientos de 11,7 g /100g CWM, 13,4 g /100g CWM y 3,88 g /100g CWM respectivamente. Selvendran (1985) aisló fracciones enriquecidas en pectina a partir de manzanas y remolacha azucarera por diferentes métodos de extracción y, para manzanas, obtuvo un rendimiento de 20,9 g /100g CWM cuando el aislamiento se realizó con oxalato y 10 g /100g CWM cuando el aislamiento se realizó con clorito y ácido acético, mientras que para las fracciones aisladas a partir de remolacha, obtuvo un rendimiento de 8,5 g /100g CWM usando agua caliente, 7,4 g /100g CWM utilizando oxalato y 23 g /100g CWM aislada con clorito y ácido acético.

Debido al bajo rendimiento obtenido con el pre-tratamiento CO, se realizaron los posteriores estudios exclusivamente con las fracciones aisladas luego del pre-tratamiento B.

Composición Química

Como se observa en la **Tabla 2**, las fracciones enriquecidas en pectina resultaron estar principalmente constituidas por carbohidratos cuyos valores fueron de entre 58 y 73 g/100g. El contenido de ácidos urónicos tomó valores entre 39 y 60 g/100g en las fracciones.

El contenido de almidón presentó un mínimo de 0,44 g/100g en la fracción B-C, y un máximo en la fracción B-H de 17,5 g/100g (**Tabla 2**). Fissore (2009) determinó un mayor contenido de almidón en fracciones enriquecidas en pectina aisladas a partir de tejidos de calabaza y de raíz de remolacha roja, por acción de la enzima hemicelulasa utilizada en este trabajo, y sugirió que la degradación de las hemicelulosas permitiría la liberación de almidón físicamente retenido en la red de celulosa - xiloglucano o de hemicelulosas de otro tipo, en la pared celular.

La concentración de proteínas fue, aproximadamente, de 3 g/100g (**Tabla 2**) para todas las fracciones y los polifenoles presentaron valores entre 0,21 y 0,24g /100g.

Los grupos carboxilo de las unidades de ácido galacturónico en la molécula de pectina, suelen estar parcialmente esterificados con metanol y las pectinas comerciales tienen un grado de metilación típico entre 55 y 75% (Lopes Da Silva y Rao, 2006). Todas las fracciones estudiadas en el presente trabajo contenían pectina de muy bajo grado de metilación (< 50 %) y bajo grado de acetilación (**Tabla 2**), lo cual se atribuye al pre-tratamiento básico realizado.

Si bien la fracción B-C fue la que se obtuvo con el mayor rendimiento, el hecho que posea un alto contenido de almidón limita la aplicación industrial de la pectina para aquellos productos de valor glucídico reducido.

La comparación estadística de la composición química de las fracciones permite observar que el contenido de carbohidratos totales y el de ácidos urónicos es significativamente menor para B-C. El contenido de almidón presenta un valor significativamente mayor para B-H, siendo el menor valor el observado para B-C. El contenido de metanol fue significativamente mayor para B-SE.

Tabla 2. Composición química de las fracciones enriquecidas en pectina aisladas a través de un pre-tratamiento básico (B) y una hidrólisis enzimática con hemicelulasa (H), celulasa (C) o sin enzima (SE) de residuos de remolacha roja.

Composición	B-SE	B-H	B-C
Carbohidratos Totales (g/100g)	73 ± 4**a**	71 ± 1ª	58 ± 3**b**
Ácidos Urónicos (g/100g)	57 ± 3**a**	60 ± 3ª	39 ± 2**b**
Almidón (g/100g)	5,61 ± 0,01**a**	17,54 ± 0,18**b**	0,44 ± 0,04**c**
Proteínas (g/100g)	3,54 ± 0,24**a**	3,26 ± 0,03**a**	3,35 ± 0,10**a**
Polifenoles (g/100g)	0,241 ± 0,032**a**	0,213 ± 0,012**a**	0,208 ± 0,003**a**
Metanol (g/100g)	0,033± 0,004**a**	0,008± 0,004**b**	0,005± 0,002**b**
DM (%)[1]	0,32	0,11	0,07
Grupos Acetilos (g/100g)	1,91 ± 0,22**a**	2,64 ± 0,21**b**	3,02 ± 0,02**b**
DA (%)[2]	0,26	0,26	0,29

La composición química de los productos se expresa como g de componente por 100g de fracción aislada.

[1]DM (grado de metilación) y [2]DA (grado de acetilación) se calcularon como una relación porcentual entre moles de metanol o grupos acetilo y moles de ácidos urónicos por 100 g de muestra.

Se reportan media y desvío estándar (n = 3).

Distintas letras minúsculas, indican diferencias significativas ($p<0,05$).

CONCLUSIONES

A partir de los residuos de la industrialización de la remolacha roja, *Beta vulgaris* var. *conditiva*, se aislaron fracciones de fibra dietaria enriquecidas en pectina de bajo grado de metilación.

El pre-tratamiento con hidróxido de sodio del residuo insoluble en alcohol, seguido por tratamiento con hemicelulasa en buffer citrato de sodio (pH 5,2) permitió aislar la fracción de mayor rendimiento pero con un alto contenido de almidón, lo cual limita el uso de dicha fracción como aditivo para el desarrollo de alimentos saludables. La fracción aislada sin enzimas tuvo un alto rendimiento y un alto contenido de ácido galacturónico. El mayor rendimiento se obtuvo con la enzima celulasa.

Las fracciones aisladas, pueden ser utilizadas como agentes espesantes y gelificantes en presencia de calcio.

El aprovechamiento de los residuos de la industrialización de vegetales, contribuye a la disminución de la polución ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

AACC. 2000. Approved methods of the AACC. Method 76.13. 10th ed. American Association of Cereal Chemistry (AACC), St. Paul, Minnesota, USA.

Brejnholt SM. 2010. Pectin. En: A Imeson (Ed). Food Stabilisers, thickeners and gelling agents. Iowa: Blackwell publising Ames. pag 237-262.

CAA. 2016. Código Alimentario Argentino. Ministerio de Salud Pública de la Argentina, www.anmat.gov.ar/CODIGOA/CAA1.htm

Chesson A. 2006. Dietary fiber. En: A.M. Stephen, G.O. Phillips & P.A. Williams (Eds.) *Food Polysaccharides and Their Applications*, Second Edition, EEUU: CRC Press, pag 629 – 663.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Robers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350 - 356.

Endress HU, Mattes F, Norz H. 2005. Pectins. En: Y.H. Hui (Ed.), Handbook of Food Science Technology and Engineering, Volume 3, EE.UU.: Marcel Dekker.

Filisetti-Cozzi TM, Carpita NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical Biochemistry, 197: 157 - 162.

Fissore EN, Ponce NMA, Matkovic L, Stortz CA, Rojas AM, Gerschenson LN. 2011. Isolation of pectin-enriched products from red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) wastes: composition and functional properties. Food Science and Technology International, 17: 517 - 527.

Fissore E. 2009. Obtención de productos enriquecidos en pectina a partir de residuos de la industrialización de calabaza (*Cucurbita Moschata* Duch Ex Poiret) y remolacha (*Beta Vulgaris* L. var. *conditiva*), y su caracterización. Ph D Thesis - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Fissore EN, Ponce NM, Wider EA, Stortz CA, Gerschenson LN, Rojas AM. 2009. Commercial cell wall hydrolytic enzymes for producing pectin enriched products from butternut (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). Journal of Food Engineering, 93: 293 - 301.

Fry SC. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annual Review of Plant Physiology, 37: 165 - 186.

Jalili T, Medeiros D, Wildman R. 2007. Dietary fiber and coronary heart disease. En: R. Wildman (Ed.) Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Second Edition, EE.UU.: CRC Press.

Lopes da Silva JA, Rao MA. 2006. Pectins: structure, functionality, and uses. En: A.M. Stephen, G.O. Phillips & P.A. Williams (Eds.), Food Polysaccharides and Their Applications, Second Edition, EE.UU.: CRC Press, pag 353 - 411.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265 - 275.

Marry M, McCann MC, Kolpak F, White AR, Stacey NJ, Roberts K. 2000. Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 17-28.

Martin-Cabrejas MAM, Waldron KW, Selvendran RR. 1994. Cell wall changes in spanish pear during ripening. Journal of Plant Physiology, 144: 541 - 548.

Matos-Chamorro A, Chambilla-Mamani E. 2010. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1: 4 - 17.May CD. 1990. Industrial pectins - Sources, production and applications. Carbohydrate Polymers 12:79-99.
Meisner N, Muños K, Restovich R, Zapata ME, Camoletto S, Torrent MC, Molinas J. 2011. Fibra Alimentaria: consumo en estudiantes universitarios y asociación con Síndrome de Intestino Irritable. Invenio, 14: 91 - 100.
Miller Jones J. 2014. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the 'fiber gap'. Nutrition Journal 2014, 13: 34-44.
Naumenko IV, Phillipov MP. 1992. Colorimetric method for determination of acetyl groups in pectic substances. Akad Nauk Rep Moldova Biol i Khim Nauki, 1: 56 – 59.
Nayak CA, Chetana S, Rastogi NK, Raghavarao KSMS. 2006. Enhanced mass transfer during solid-liquid extraction of gamma-irradiated red beetroot. Radiation Physics and Chemistry, 75: 173-178.
Nawirska A, Kwasniewska M. 2005. Dietary fiber fractions from fruit and vegetable processing waste. Food Chemistry, 91: 221 - 225.
Selvendran RR. 198). Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. Journal of Cell Science, 2: 51 - 88.
Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144 - 158.
Sokal RR, Rohlf JB. 2000. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: WH Freeman and Company, pp. 253-380.
Waldron KW, Ng A, Parker ML, Parr AJ. 1997. Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of Beta vulgaris and their possible role in texture. Journal of the Science of Food and Agriculture, 74: 221- 228.
Wood PJ, Siddiqui IR. 1971. Determination of methanol and its application for measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. Analytical Biochemistry, 39: 418 - 428.
Yapo BM. 2011. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. Carbohydrate Polymers, 86: 373 - 385.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Universidad de Buenos Aires UBACYT, ANPCyT y CONICET.

Agregado de valor a residuos de la industria oleaginosa: ceras de cáscara de girasol

Fanesi D.S.[1], Rodríguez M.M.[1,2], Nolasco S.M.[1, 3]

(1) TECSE, Dpto. Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNCPBA, Av. del Valle 5737, 7400, Olavarría, Buenos Aires, Argentina.
(2) CCT Tandil (CONICET), Pinto 399, 7000, Tandil, Buenos Aires, Argentina.
(3) CIC - Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.
mariamarcelarodriguez@hotmail.com

RESUMEN
La recuperación de ceras presentes en la cáscara de girasol, residuo del procesamiento de los granos puede ser de interés industrial, por ello el objetivo del trabajo fue evaluar la variabilidad del contenido de las mismas en híbridos cultivados en Argentina, analizando el efecto genético y ambiental. Se emplearon muestras de los híbridos SyN3840, SyN3950 y DK4065 (Syngenta), CF201 (Advanta) y PAN7077 (Pannar), correspondientes a la Red de Ensayos Comparativos de Rendimientos Buenos Aires Sur y La Pampa, seleccionando dos ambientes: Balcarce y Tandil (provincia de Buenos Aires). Las cáscaras fueron obtenidas por descascarado mecánico de los granos, extrayendo posteriormente su aceite (Soxhlet, n-hexano). Las ceras se precipitaron con acetona a 4ºC del aceite solubilizado en hexano, determinando gravimétricamente su contenido. El contenido de cáscara varío significativamente entre 20,6±0,1-26,9±0,4 % según el tipo de híbrido ($p \leq 0,0001$), el ambiente ($p \leq 0,0050$) y su interacción ($p \leq 0,0027$). Los híbridos cultivados en Balcarce y Tandil presentaron rendimientos de ceras comprendidos entre 0,64±0,05-1,56±0,54 y 0,53±0,17-1,25±0,31 g cera/100 g cáscara de girasol b.s., respectivamente; siendo afectado significativamente los mismos por el tipo de híbrido ($p \leq 0,0175$). Los resultados de este estudio aportan una información valiosa relacionada con el otorgar valor agregado a un residuo de la industria aceitera.

Palabras clave: girasol, cáscara, ceras.

ABSTRACT
The recovery of waxes present in the sunflower hull, waste of processing of grains, may be of industrial interest, so the objective was to evaluate the variability of the content of these in hybrids grown in Argentina, analyzing the genetic effect and environmental. Samples of hybrids SyN3840, SyN3950 and DK4065 (Syngenta), CF201 (Advanta) and PAN7077 (Pannar) corresponding Network Comparative Trials Yield Buenos Aires Sur and La Pampa were used, selecting two environments: Balcarce and Tandil (Province from Buenos Aires). The hulls were obtained by mechanical husking grain, then extracting its oil (Soxhlet, n-hexane). Waxes are precipitated with acetone at 4°C the oil solubilized in hexane, gravimetrically determining their contents. The hull content varied significantly between 20.6±0.1 to 26.9±0.4% depending on the type of hybrid ($p \leq 0.0001$), the environment ($p \leq 0.0050$) and their interaction ($p \leq 0.0027$). Hybrids in Balcarce and Tandil had yields ranging from 0.64±0.05-1.56±0.54 and 0.53±0.17-1.25±0.31 g wax/100 g sunflower hull b.s., respectively, being significantly affected by the type of hybrid ($p \leq 0.0175$). The results of this study provide valuable information related to the value added to give a residue of the oil industry.

Keywords: sunflower, hull, waxes.

INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L) es una de las oleaginosas más importantes en el mundo, que se adapta a una amplia variedad de condiciones ambientales (Baümler et al. 2007, Franchini et al. 2010). El grano de girasol está formado mayoritariamente por la pepa (75-80%), cubierta por sus tegumentos y la cáscara o pericarpio.

El contenido de cáscara varía entre 20-50%, siendo menor en los girasoles aceiteros (20-28%) con respecto a los confiteros (40-50%) (Salunkhe et al. 1992). Los constituyentes de la cáscara están representados por la fracción holocellósica (celulosa: 31-51%, hemicelulosa 13-28%), lignina (20%), proteína (4-6%), cenizas (2-6%) y lípidos (5%, de los cuales hasta un 3% pueden ser ceras) (Francois 1964, Cancalon 1971, Morrison et al. 1981, Bazus et al. 1992).

Los granos son parcialmente descascarados antes del proceso de extracción de aceite, hasta alcanzar un rango de 10-12% de cáscara residual, lo que reduce el procesamiento de materia prima innecesaria y tiene efectos beneficiosos sobre la calidad del aceite crudo y harina residual (Dorrell y Vick 1977, Aguirrezábal y Pereyra 1998). La calidad del aceite de girasol, que se sintetiza y acumula en la pepa, es afectada por la presencia de compuestos minoritarios como las ceras, que se encuentran principalmente sobre la superficie de la cáscara (Carelli et al. 2002, Martini y Añón 2005, Franchini et al. 2010). Las ceras de girasol son ésteres de ácidos grasos saturados con alcoholes (36-60 átomos de carbono). Las ceras con longitudes de cadena menores a 40 átomos de carbono son solubles en el aceite, aquellas con longitudes entre 40-43 son parcialmente solubles y las que tienen 44 o más átomos de carbono se denominan ceras insolubles, que contribuyen al desarrollo de la turbidez cuando los aceites son almacenados a bajas temperaturas, perjudicando su posterior procesamiento y calidad comercial (Carelli et al. 2002, Baümler et al. 2007, Sindhu Kanya et al. 2007, Carrín y Carelli 2010, Carelli et al. 2012). Por lo tanto, las ceras tienen que ser retiradas en el proceso de refinación (winterización), añadiendo al proceso industrial de extracción de aceite un costo extra (Martini y Añón 2005, Franchini et al. 2010).

En Argentina, vía mejoramiento genético, manejo del cultivo y consideraciones ambientales, se ha logrado un notable incremento en el contenido de aceite de granos de girasol, sin embargo, paralelamente se observó una disminución en el contenido de cáscara en el grano y un incremento en la presencia de ceras (Santalla et al. 1993, Fernández et al. 2001, Martini y Añón 2005). El contenido y el perfil de las ceras en el aceite dependen de tipo de híbrido, origen, condiciones ambientales, eficiencia del descascarado y la tecnología usada en el proceso de extracción de aceite (Morrison 1983, Carelli et al. 2002, Martini y Añón 2005, Nolasco et al. 2007, Baümler et al., 2007). Los aceites obtenidos por extracción con solvente tienen un contenido de cera más alto que los obtenidos por extracción por prensa (Baümler et al. 2007, Sindhu Kanya et al. 2007, Carrín y Carelli 2010). Por lo tanto, la distribución y la cantidad de ceras en un aceite vegetal es un buen indicador de su calidad y autenticación (Carelli et al. 2012).

El descascarado del grano de girasol origina una cantidad importante de residuo de bajo peso especifico (aprox. 0,1 ton/m^3), el cual actualmente es empleado por las plantas aceites como combustibles para sus calderas, con diferentes inconvenientes técnicos y económicos. El aprovechamiento de la cáscara de girasol, en cuya superficie se acumula principalmente la cera, es considerado industrialmente un problema de no fácil solución. Por otra parte, actualmente existe una tendencia a reemplazar las ceras sintéticas por naturales en diversas aplicaciones industriales, tales como cosméticos, productos farmacéuticos, film biodegradables, alimentos, etc. Las ceras de girasol han sido reportadas como eficaces gelificantes, aún en bajas concentraciones, para la fabricación de organogeles con aceites comestibles, demostrándose su viabilidad para sustituir la fase grasa sólida, que contiene ácidos grasos trans y satudados, en la formulación de productos tales como por margarinas. En este contexto, es prometedor la recuperación de ceras de las cáscaras de girasol, para su transformación en productos industriales de alto valor agregado. Es por ello, que en este trabajo se evalúa la variabilidad del contenido de ceras en cáscaras de híbridos de girasol cultivados en Argentina, analizando el efecto genético y el ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Híbridos

Se emplearon muestras de híbridos correspondientes a la Red de Ensayos Comparativos de Rendimientos Buenos Aires Sur y La Pampa (2012/2013), seleccionando dos ambientes: Balcarce (37º45´S, 58º18´W) y Tandil (37º14´S, 59º15´W), provincia de Buenos Aires, Argentina. Se trabajó con los híbridos SyN3840, SyN3950 y DK4065 (Syngenta), CF201 (Advanta) y PAN7077 (Pannar).

Caracterización de las muestras

Las propiedades físicas y la composición proximal de las cáscaras fueron determinadas. Se caracterizaron en cuanto a contenido y espesor de cáscara (micrómetro), y composición proximal: humedad (AOCS Af 2-54, 1998), contenido de aceite (IUPAC, 1992), fibra cruda (AOCS Ba 6-84, 1998), proteína (AOAC, 1990) y ceniza (AOCS Ba 5a-49, 1998). Todos los resultados fueron expresados como porcentaje en peso sobre base seca (%, b.s.).

Obtención de las cáscaras de girasol

Las muestras de granos fueron limpiadas en forma manual por separación de la materia extraña sobre una superficie clara. Las cáscaras fueron obtenidas por descascarado mecánico de los granos, empleando un equipo piloto que origina ruptura de la misma por impacto (de Figueiredo et al., 2011). Del producto obtenido se separaron manualmente las cáscaras y luego se conservaron en envases plásticos cerrados herméticamente a 5±1ºC.

Extracción de aceite

La extracción del aceite se realizó en un equipo Soxhlet, utilizando n-hexano como solvente durante 4 h (IUPAC, 1992). Luego el solvente fue removido del aceite en un rotavapor R-114 (Büchi, Suiza) a 40ºC y a presión reducida, seguido de un secado en estufa de vacío hasta completar la eliminación del hexano (peso constante del aceite). El contenido de aceite se determinó gravimétricamente y se expresó como porcentaje en peso sobre base seca.

Extracción y cuantificación de ceras

Para extraer las ceras se solubilizó el aceite en hexano usando una relación de 1/10 (aceite/hexano). Los extractos obtenidos se precipitaron con acetona en una relación de 1/10 (aceite/acetona) y a 4ºC. La cera precipitada se separó de los solventes por centrifugación a 4ºC durante 10 minutos y a 2000 rpm (Centrífuga Presvac refrigerada MSP-4650 R PLUS, Buenos Aires, Argentina), seguido de una desolventización en atmósfera de N_2. El contenido de cera se determinó gravimétricamente y se expresó como g de cera cada 100 g de cáscara de girasol en base seca.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA y para la comparación de medias se utilizó el Test de Tukey. El análisis estadístico se realizó con un nivel de significación del 5%, utilizando el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las propiedades físicas y la composición proximal de las cáscaras de girasol se muestran en las **Tablas 1** y **2**, respectivamente.

Tabla 1. Propiedades físicas de las cáscaras de los híbridos de girasol cultivados en las ciudades de Balcarce y Tandil, respectivamente.

Variabilidad genética (híbridos)	Variabilidad ambiental	Cáscara (%, b.s.)	Espesor (mm)
SyN3840	Balcarce	21,4±0,6	0,25±0,01
	Tandil	20,6±0,1	0,27±0,01
SyN3950	Balcarce	24,8±0,2	0,30±0,04
	Tandil	26,9±0,4	0,42±0,02
DK4065	Balcarce	22,4±0,5	0,29±0,01
	Tandil	21,9±1,2	0,30±0,01
CF201	Balcarce	21,0±0,2	0,24±0,01
	Tandil	21,7±0,5	0,32±0,05
PAN7077	Balcarce	21,4±0,2	0,31±0,01
	Tandil	24,1±0,5	0,34±0,02

El contenido de cáscara varió en un rango de 20,6 a 26,9 % b.s., detectándose diferencias significativas entre híbridos ($p \leq 0,0001$) y entre ambientes ($p \leq 0,0050$), siendo también significativa la interacción entre ambas variables ($p \leq 0,0027$). Cabe destacar, que los híbridos SyN3840 y SyN3950, cultivados en Tandil, presentaron el contenido más bajo y más alto de cáscara, respectivamente. Además, se observó que el contenido de cáscara fue superior, en la mayoría de los casos, en los híbridos provenientes de Tandil. Los

valores de contenido de cáscara (**Tabla 1**) están en concordancia con los publicados por Baümler et al. (2007), quienes reportaron un valor de contenido de cáscara de 24,7% b.s. Por otra parte, el espesor de las cáscaras estuvo comprendido entre 0,24 y 0,42 mm, siendo significativamente superior en los híbridos cultivados en Tandil ($p \leq 0,0006$). El tipo de híbrido también afectó significativamente al espesor de la cáscara ($p \leq 0,0004$), destacándose las muestras CF201 (Balcarce) y SyN3950 (Tandil) por presentar el valor más bajo y el más alto, respectivamente. Además, es de interés resaltar que se observó una correlación lineal entre el contenido de cáscara y el espesor de las mismas ($R^2=0,6718$, $p \leq 0,0008$; $p \leq 0,0037$), pudiendo observarse que los híbridos que presentaron altos contenidos de cáscara, también exhibieron valores altos de espesor.
En relación a la composición proximal, el contenido de aceite fue el componente de la cáscara que presentó mayor variabilidad (C.V.: 35,3 %), seguido por el contenido de proteína y de humedad (C.V.: 12,9% y 10,8 %, respectivamente), siendo más baja la variación observada para el contenido de cenizas y de fibra cruda (C.V.: 8,5 % y 3,8 %, respectivamente).
Según el análisis estadístico, la interacción híbrido*ambiente fue significativa ($p \leq 0,05$) para todos los componentes de la cáscara con excepción del contenido de aceite. En la localidad de Balcarce se obtuvieron contenidos de aceite en las cáscaras mayores que en Tandil; mientras que los híbridos SyN3840 y DK4065 presentaron valores significativamente superiores.

Tabla 2. Composición proximal de las cáscaras de los híbridos de girasol cultivados en las ciudades de Balcarce y Tandil, respectivamente.

Variabilidad genética (híbridos)	Variabilidad Ambiental	Humedad (%, b.s.)	Aceite (%, b.s.)	Fibra cruda (%, b.s.)	Proteina (%, b.s.)	Ceniza (%, b.s.)
SyN3840	Balcarce	11,74±0,06	9,45±0,65	58,83±0,08	7,04±0,13	3,50±0,01
	Tandil	12,04±0,01	6,33±0,95	60,13±0,38	6,88±0,13	3,42±0,03
SyN3950	Balcarce	9,48±2,84	4,60±0,31	59,69±0,19	5,36±0,0004	3,47±0,05
	Tandil	14,77±0,39	3,11±0,50	63,81±0,34	5,42±0,005	2,92±0,02
DK4065	Balcarce	12,14±0,36	8,46±0,58	58,90±0,08	6,18±0,33	3,70±0,04
	Tandil	12,17±0,62	5,97±0,87	60,57±0,60	6,32±0,27	3,61±0,02
CF201	Balcarce	12,10±0,20	7,73±0,43	58,27±0,95	8,09±0,26	3,38±0,04
	Tandil	11,97±0,48	5,10±0,43	55,87±0,26	6,64±0,07	3,50±0,04
PAN7077	Balcarce	11,07±0,05	5,08±0,84	60,37±0,36	6,08±0,39	4,11±0,01
	Tandil	12,20±0,13	3,45±0,22	62,95±0,21	7,29±0,05	3,39±0,02

En comparación con los datos bibliográficos de composición proximal, cabe destacar, que las humedades obtenidas en el presente trabajo (9,48-14,77%b.s.) son superiores, en la mayoría de los casos, a las publicadas por otros autores como Mohamed y Taha (2005) (8,53-9,80% b.s.). El contenido de aceite (3,11-9,45% b.s.) fue en general más alto que el reportado por Cancalon (1971) (5,1% b.s.); Mohamed y Taha (2005) (1,65-2,20% b.s.); Baümler et al. (2007) (2% b.s.); Freeman (2008) (3,9% b.s.) y de Figueiredo et al. (2015), en tres híbridos, (1,20; 2,18; 2,83 %b.s.) pero inferior al publicado por Taha et al. (2012) (10,47% b.s.). Por otra parte, los valores de fibra obtenidos (55,87-63,81% b.s.) fueron mayores a los descriptos por Mohamed y Taha (2005) (18,82-20,05% b.s.); Freeman (2008) (44% b.s.) y Taha et al. (2012) (43,92% b.s.). Los valores de proteína (5,36-8,09 % b.s,) también fueron en general superiores a los reportados por Cancalon (1971) (4% b.s.); Mohamed y Taha (2005) (4,33-6,14% b.s.) y Freeman (2008) (5% b.s.) e inferiores al obtenido por Taha et al. (2012) (12,6% b.s.). Por otra parte, el contenido de ceniza (2,92-4,11%b.s.) fue más alto que el de las muestras estudiadas por Mohamed y Taha (2005) (1,35-1,68% b.s.) y por Taha et al. (2012) (2,78% b.s.).
El contenido de cera en las cáscaras de los híbridos de girasol cultivados en Balcarce y Tandil se presenta en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Contenido de cera de los híbridos de girasol cultivados en las ciudades de Balcarce y Tandil, respectivamente.

Variabilidad genética (híbridos)	Contenido de cera (g/100 g cáscara de girasol b.s.)	
	Balcarce	Tandil
SyN3840 [ab]	0,64±0,05	1,01±0,16
SyN3950 [ab]	0,78±0,24	0,90±0,09
DK4065 [b]	1,56±0,54	1,25±0,31
CF201 [ab]	0,95±0,31	0,66±0,23
PAN7077 [a]	0,75±0,14	0,53±0,17

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre híbridos según Test de Tukey.

Los híbridos pertenecientes a la ciudad de Balcarce presentaron rendimientos de ceras comprendidos entre 0,64±0,05 y 1,56±0,54 g cera/100 g cáscara de girasol b.s., perteneciendo estos valores a las muestras SyN3840 y DK4065, respectivamente. Por otra parte, los híbridos cultivados en Tandil exhibieron valores de contenido de cera entre 0,53±0,17 y 1,25±0,31 g cera/100 g cáscara de girasol b.s., para las muestras PAN7077 y DK4065, respectivamente. El contenido de cera no fue afectado estadísticamente por el ambiente de cultivo, mientras que si fue influenciado significativamente por el tipo de híbrido analizado ($p \leq 0,0175$), siendo PAN7077 y DK4065 los híbridos que presentaron valores de cera más bajo y más alto, respectivamente.

Los rendimientos de ceras obtenidos en este trabajo son, en su gran mayoría, superiores a los reportados por Franchini et al. (2008), quienes determinaron un contenido de ceras epicuticulares entre 0,44 y 0,71 g cera/100 g cáscara de girasol en híbridos cultivados con un déficit moderado de agua. Por otra parte, Soomro y Sherazi (2013) obtuvieron valores de ceras inferiores de 0,45±0,13 g/100 g de cáscara b.s., mientras que, Baümler et al. (2007) reportaron valores superiors de 3,47 g/100 g b.s.

Por otra parte, no se detectó relación significativa entre el contenido de ceras y el contenido de cáscara en el grano, así como con ninguna de las propiedades de la cáscara analizadas.

CONCLUSIONES

Los rendimientos de cera estuvieron comprendidos entre 0,53±0,17 y 1,56±0,54 g cera/100 g cáscara de girasol b.s. Los híbridos PAN7077 y DK4065 difirieron significativamente entre sí por presentar el valor más bajo y mal alto, respectivamente. Por otra parte, el lugar de origen de las muestras no tuvo incidencia sobre el contenido de cera. Los resultados de este estudio aportan una información valiosa relacionada con el otorgar valor agregado a un residuo de la industria aceitera.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirrezábal LAN, Pereyra VR. 1998. Coordinadores: Aguirrezábal, L.A.N. & Andrade, F., “Girasol en calidad de productos agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico”. Edición de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP) y de la Estación Experimental Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 139-196.

AOAC. 1990. Official methods of analysis, 15th edn. AOAC International, Gaithersburg, USA, 1067p.

AOCS. 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists’ Society. AOCS Press, Champaign, USA.

Baümler ER, Crapiste GH, Carelli AA. 2007. Sunflower-Oil wax reduction by seed solvent washing. Journal of the American Oil Chemists' Society, 84: 603-608.

Bazus A, Rigal L, Gaset A. 1992. Valorisation des coques de tournasol; bilan et perspectives. Revue Francaise des Corps Gras, 39(11-12): 345-350.

Cancalon P. 1971. Chemical Composition of sunflower seed hulls. Journal of the American Oil Chemists' Society, 48: 629-932.

Carelli A, Baümler E, Ceci LN. 2012. Improved method for the determination of wax esters in vegetable

oils. European Journal of Lipid Science and Technology, 114(11): 1312–1319.
Carelli AA, Frizzera LM, Forbito PR, Crapiste GH. 2002. Wax Composition of Sunflower Seed Oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, 79: 763-767.
Carrín ME, Carelli AA, in: Tomás, M. (Ed.), Advances inFats Oil Research, Editorial Research Signpost, Trivandrum (India) 2010, pp. 25–48.
de Figueiredo AK, Baümler E, Riccobene IC, Nolasco SM. 2011. Moisture-dependent engineering properties of sunflower seeds with different structural characteristics. Journal of Food Engineering, 102: 58-65.
de Figueiredo AK, Rodríguez LM, Fernandez M, Riccobene IC, Nolasco SM. 2015. Loss of lipid material during the dehulling of oilseeds with different structural characteristics. Journal of Food Science and Technology, DOI 10.1007/s13197-015-1910-4.
Dorrell DG, Vick BA. 1977. Properties and processing of oilseed sunflower. Sunflower Technology and Production. Schneiter (ed.) American Society of Agronomy Inc., Publishers Madison, 709-745.
Fernández MB, Riccobene IC, Nolasco SM. 2001. Some factors that affect the dehulling ability of sunflower achenes. Proceedings of the 8th International Congress on Engineering and Food (ICEF 8). Technomic Publishing Co., Lancaster, USA, I (VII), 971-976.
Franchini MC, Hernández LF, Lindström LI. 2010. Cuticle and cuticle wax development in the sunflower (Helianthus annuus L.) pericarp grown at the field under a moderate water deficit. Internacional Journal of Experimental Botany fYTON, 79: 153-161.
Franchini MC, Lindströn L, Hernández LF. 2008. Epicuticular wax content in the pericarp of sunflower fruits (Helianthus annuus L.) grown under moderate water deficit. Proc. 17th International Sunflower Conference, Spain, 249-253.
Francois R. 1964. Les coques d´oléagineux traitment-utilisations. Journees D¨iInformation, 60-67.
Freeman DW. 2008. Use of by-products and non-traditional feeds for horses. http://en.engormix.com/ MA-equines/nutrition/articles/use-byprduct-nontraditional feeds- t1082/141-p0.htm.
Infostat Group, Infostat versión. 2004. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina 2004.
IUPAC. 1992. Standard Methods for the Analysis of oils, Fats and Derivates. (7th ed.) Eds. Paquot C, Hautffenne A. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell.
Martini S, Añón MC. 2005. Storage of sunflower-seeds: variation on the wax content of the oil. European Journal of Lipid Science and Technology, 107: 74-79.
Mohamed GF, Taha FS. 2005. Extraction of sunflower hulls: their antioxidant activity on lipids of cooked mackerel fish. Alex. J. Food. Sci. Technol., (2):11-23.
Morrison WH, Akin DE, Roberston JA. 1981. Open pollinated and hybrid sunflower seed structures that may affect processing for oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 58: 969-972.
Morrison WH. 1983. Variation in wax content of sunflower seeds with location and hybrids. Journal of the American Oil Chemists' Society, 60: 1013-1015.
Nolasco SM, Aguirerzábal LAN, Quiroz F, Constenla DT, Cocconi M, Carelli AA. 2007. Variabilidad en la composición de ceras en el aceite de híbridos de girasol cultivados en Balcarce (Argentina). Proceedings XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Argentina.
Salunkhe DK, Chavan JK, Adsule RN, Kadan SS. 1992. Sunflower in World oil seeds. Chemistry Technology and Utilization, Published by Van Nostrand Reinhold, New York, 97-139.
Santalla EM, Riccobene IC, Nolasco SM. 1993. Compositional data on sunflower seed grown in Argentine. Grasas y Aceites, 44(3): 175-178.
Sindhu Kanya TC, Jaganmohan Rao L, Shamanthaka Sastry MC. 2007. Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. Food Chemistry, 101: 1552-1557.
Soomro RK, Sherazi STH. 2013. Extraction and characterization of seed oil waxes by using chromatographic techniques. International Journal of Industrial Chemistry, 4(9): 1-7.
Taha FS, Wagdy SM, Hassanein M.M.M., Hamed SF. 2012. Evaluation of the biological activity of sunflower hull extracts, 63(2): 184-192.

Parámetros fisicoquímicos de calidad y textura de frutos del noreste argentino sometidos a almacenamiento congelado

Fernández NL[1,2], Montenegro SB[1], Yamul DK[2], Navarro AS[2,3]

(1) Facultad de Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAus). Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco.
(2) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), CCT La Plata, CONICET.
(3) Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata.
albanavarro@conicet.gov.ar

RESUMEN

El objetivo fue seleccionar frutos (mamón y pomelo) en diferentes estados de madurez, congelarlos, determinar sus parámetros fisicoquímicos y de textura y su contenido de polifenoles. Los frutos fueron recolectados en Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, seleccionando dos lotes en estado verde-maduro y maduro. Los frutos se almacenaron 30 días a -20°C y se realizaron las determinaciones en los productos frescos y congelados. Se midió altura, diámetro, rendimiento de pulpa, pH, acidez titulable, grados Brix y grado de madurez. El color superficial se determinó con colorímetro de superficie y el contenido de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu. Se realizaron ensayos de punción en texturómetro. El almacenamiento congelado disminuyó los parámetros de color a*, b* y L* en mamones y modificó en menor medida los de pomelos. La fuerza máxima de punción en los pomelos no varió luego de la congelación, en cambio aumentó en los mamones maduros y disminuyó en los verdes. El contenido de polifenoles de ambas frutas en los dos estados de madurez fue mayor luego de la congelación excepto en mamones verdes. Ambas frutas preservadas pueden considerarse para elaborar alimentos de alto valor nutricional ya que la congelación fue apropiada para mantener los parámetros de calidad.

Palabras clave: Mamón, Pomelo, Congelación, Parámetros fisicoquímicos, Textura, Polifenoles.

ABSTRACT

The objective was to select fruits (papaya and grapefruit) at different stages of maturity and determine physicochemical parameters, texture and polyphenol content after freezing conditions of the samples. The fruits were collected in Presidencia Roque Saenz Peña, Chaco. Two batches of 15 fruits each in two stages of maturity were selected. The fruits were stored at -20° C for 30 days. Height, diameter, yield, pH, titratable acidity and Brix degree were determined in the samples. Color was measured by a superficial colorimeter and polyphenol content was determined by Folin-Ciocalteu method. Puncture tests were carried out in a texturometer. Frozen storage decreased color values a*, b* and L* in papaya, grapefruit color was mantained. Puncture strength in the fruit did not change after freezing, but increased in ripe papaya and decreased in green papaya. The polyphenol content of the fruits in both states of maturity increased after freezing, except in green papaya. Both frozen fruits can be considered for the production of food of high nutritional value due to the quality parameters obtained.

Keywords: Mamon, Grapefruit, Freezing, Physico-chemical parameters, Texture, Polyphenols.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales a base de frutas pueden aportar gran cantidad de compuestos bioactivos como vitaminas, minerales, antioxidantes y fibra, que incrementan el valor nutricional y son beneficiosos para la salud (Sun-Waterhouse et al. 2011). Estudios recientes han reportado que la ingesta de frutas y verduras

disminuye el riesgo de enfermedades crónicas, tales como las relacionadas con el corazón y el cáncer (Gorinstein et al. 2004). Por otro lado, la utilización de frutas regionales brinda una alternativa para el desarrollo de alimentos con un grado mínimo de procesamiento cuyas propiedades organolépticas, en algunos casos, permanecen muy cercanas a las del producto fresco (Avallone et al. 1997).

El noreste argentino (NEA), particularmente en la región chaqueña, es rico en frutas como el mamón y el pomelo, los cuales poseen gran cantidad de compuestos activos. El mamón o papaya (*Carica papaya* L.), además de carotenoides, vitamina C y magnesio, es una fuente rica de isotiocianatos biológicamente activos que son compuestos fitoquímicos que brindarían una potencial protección contra el cáncer (Wall et al. 2006). En el caso del pomelo (*Citrus grandis*), sus compuestos bioactivos principales son carotenoides, fenoles y vitamina C (Jayaprakasha et al. 2008). El pomelo producido en la región del NEA se distingue particularmente por su alto contenido en azúcares y buen sabor, pero, su comercialización como fruto entero se dificulta debido a que son afectados por la cancrosis endémica en la zona. Esta enfermedad es producida por bacterias que lesionan las plantas y sus frutos pero no afecta la seguridad para su consumo. Por este motivo, los pomelos mínimamente procesados podrían ser ofrecidos al consumidor como productos atractivos de un mayor valor agregado (Pereyra y Sgroppo 2006).

La concentración de compuestos bioactivos en las frutas varía con el estado de madurez, el lugar geográfico del cultivo, las diferentes variedades y el clima (Kaur y Kapoor 2001). Durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos a base de frutas se pueden alterar la concentración y actividad biológica de dichos compuestos, algunos de los cuales son además responsables de los colores naturales de las frutas. El color es uno de los atributos de calidad observados inmediatamente, siendo necesario en los alimentos procesados mantenerlo lo más cercano posible a los valores alcanzados por la materia prima (Gómez et al. 2009). Por otro lado, la textura es otro parámetro de calidad organoléptica apreciado por el consumidor de frutas, siendo la presión de turgencia celular el principal contribuyente de ese atributo en las frutas frescas. En los frutos de textura delicada, la congelación provoca una pérdida de turgencia y firmeza. Durante la congelación, el hielo comienza a formarse en el medio extracelular y progresa a través del citoplasma cuando la membrana celular pierde la permeabilidad. La descompartimentalización causada por cristales de hielo impide el retorno de agua intracelular durante la descongelación, causando la pérdida de turgencia y, por lo tanto, alterando la textura de la fruta (Sousa et al. 2007).

El objetivo de este trabajo fue seleccionar frutos (mamón y pomelo) en diferentes estados de madurez, someterlos a almacenamiento congelado y determinar el contenido de polifenoles y sus parámetros fisicoquímicos y de textura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de la materia prima

Los pomelos y mamones fueron recolectados de árboles situados en Presidencia Roque Sáenz Peña, Departamento Comandante Fernández (provincia de Chaco), zona ubicada entre 0,5 y 6 km del casco céntrico y con temperatura media de 21,5ºC y 74% de humedad relativa promedio anual. Se seleccionaron, para cada tipo de fruta, dos lotes de 15 frutos cada uno en dos estados de madurez:

Maduro, el cual correspondió a 100% de superficie amarilla para ambos frutos.

Verde-maduro, con 50% de superficie amarillo verdoso y 50% amarillo para pomelos y 100% verde para mamones.

La recolección de los frutos se realizó en forma manual girando el producto para desprender el tallo sin roturas y daños por extirpación. Los frutos recolectados fueron transportados en bolsas plásticas hasta las instalaciones del laboratorio de la Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAus) para su procesamiento y análisis.

Parte de las muestras fueron almacenadas en cámara a -20°C durante 30 días y el resto de las frutas fueron conservadas a 4°C y analizadas dentro de los 2 días posteriores a la cosecha. Parte de las frutas en estado fresco fueron procesadas realizando la separación manual de cáliz y receptáculos y luego procediendo a la separación de las cáscaras con cuchillo. Se reservó una porción de las pulpas para análisis y el resto se

procesó en una extractora de jugos (Moulinex, Alemania), obteniéndose fracciones separadas de pulpa y zumo que fueron almacenadas en potes de plástico con tapa a -20°C durante 30 días. En la **Tabla 1** se observa la nomenclatura utilizada para las muestras analizadas.

Tabla 2. Nomenclatura utilizada para las muestras ensayadas

Tipo de fruta	Estado de madurez	Sin tratar (fresco)	Congelado
Mamón	Verde-maduro	MVF	MVC
	Maduro	MMF	MMC
Pomelo	Verde-maduro	PVF	PVC
	Maduro	PMF	PMC

Determinación de las características fisicoquímicas de los frutos

Se midió la altura y el diámetro de las frutas empleando un calibre electrónico digital (Schwiz, Argentina). El peso se determinó en balanza electrónica (ACCULAB, ALC-6100.1, Alemania) con precisión ± 0,1 g. Se determinó el rendimiento de fruta por grado de madurez y participación de componentes (pulpa, semilla, receptáculo) a partir de la separación manual de cáliz y receptáculos en frutos enteros, seguido de la separación completa de semillas, tricomas y restos de pulpa y posterior extracción y cuantificación del zumo y pulpa. Los porcentajes de estos componentes se definieron mediante balance de materia de la operación.

Se analizaron parámetros de calidad como variación de pH con peachímetro (Lutron modelo WA-2011, EE.UU.), acidez titulable por volumetría (Norma IRAM 15735) y grados Brix con refractómetro de Abbe (NAR-1T, Atago, EE.UU.). El grado de madurez (ratio) se obtuvo a través de la relación entre el valor mínimo de sólidos solubles totales (ºBrix) y el valor máximo de acidez.

El color superficial de las frutas, tanto cáscaras como pulpas, fue determinado con un colorímetro de superficie (Minolta, Japón) obteniéndose los parámetros L*, a* y b*. El parámetro L* representa la luminosidad de la muestra, tomando valores entre 0 para el negro y 100 para el blanco. El parámetro a* representa rojo para valores positivos y verde para los negativos, mientras que b* define amarillo para los valores positivos y azul para los valores negativos.

Análisis de las propiedades de textura de frutos y pulpas

Se realizaron ensayos de punción en un texturómetro para determinar las propiedades de textura de los frutos. Las condiciones del ensayo se mantuvieron constantes para cada una de las frutas analizadas, se atemperaron las muestras en estado congelado hasta temperatura ambiente (25ºC). Luego se cortaron en cubos de 7x7x7 mm de espesor. Las pruebas se realizaron en un texturómetro (Texture Analyzer TA.X2Ti, Stable Micro Systems, Reino Unido), utilizando una sonda de punción múltiple (**Fig. 1**). Se midió la fuerza en compresión con una velocidad de pre-ensayo de 5mm/s, velocidad de ensayo de 1 mm/s, velocidad de post-ensayo de 5 mm/s, distancia 50%, fuerza 0,05 Newton y velocidad de adquisición 10 pps.

Figura 1. Fotografías que muestran el procesamiento y análisis de los pomelos y mamones ensayados.

Determinación del contenido de polifenoles totales de los extractos de frutas

Se determinó el contenido de polifenoles totales en los zumos extraídos de cada fruto a través del método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Schlesier et al. 2002). Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolíbdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos,

originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. Los zumos de las frutas se obtuvieron al momento del análisis utilizando la extractora de jugos como se detalló anteriormente. Las fracciones de zumo obtenido se filtraron con papel de filtro Whatman N°1 y se tomaron alícuotas para realizar las diluciones correspondientes. Para la determinación, se colocaron 2 ml de Na_2CO_3 en tubos de ensayo, 200 µL de la muestra y 200 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (1:1) (Anedra, Argentina). Se agitaron los tubos en vortex y se dejaron en la oscuridad durante 30 min. Posteriormente se leyó la absorbancia del color azul desarrollado en un espectrofotómetro Shimadzu Double Bean Spectrophotometer UV-150-02 (Seisakusho Ltd., Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 725 nm. Se realizó la curva de calibración con ácido gálico ya que es el compuesto polifenólico comúnmente tomado como referencia durante el estudio de antioxidantes provenientes de fuentes vegetales (Borneo et al. 2009). Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Los resultados del contenido de polifenoles totales se informaron como mg ácido gálico (AG) por cada 100 g de fruta fresca.

Análisis estadístico de los datos

Los resultados obtenidos en cada ensayo por triplicado fueron tabulados y evaluados a través de análisis de varianza ANOVA, empleando diferencias mínimas significativas de Tukey como método de comparación múltiple, con un nivel de confianza del 95,0%. Dicho análisis se realizó con el programa estadístico InfoStat (InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica de los frutos en sus dos estados de madurez

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la medición de altura y diámetro de los frutos. El parámetro altura no presentó diferencias significativas ($p<0,05$) en pomelos en ambos estados de madurez, en cambio los mamones verdes-maduros presentaron mayor altura que los maduros (**Fig. 2**). La disminución de altura en el estado maduro de los mamones puede atribuirse al cambio estructural en las protopectinas insolubles, presentes en las paredes celulares, que durante la maduración se hidrolizan generando ácidos péctico y pectínico. Estos compuestos inducen al ablandamiento de tejidos, liberación de agua y pérdida de compuestos aromáticos de alta volatilidad (Ayala et al. 2013). Como se muestra en la **Tabla 2**, ambos lotes de pomelos no presentaron diferencias significativas en cuanto al diámetro al igual que los mamones, en los 2 estados de madurez ensayados. El rendimiento de fruta fue mayor en mamones que en pomelos.

Tabla 2. Valores de altura, diámetro y rendimiento de los frutos en los dos estados de madurez ensayados.

Tipo de fruta	Estado de madurez	Altura (mm)	Diámetro (mm)	Rendimiento (%)
Mamón	Verde-maduro	124,2	75,1	75,31
	Maduro	109,2	77,8	70,12
Pomelo	Verde-maduro	91,4	93,8	44,82
	Maduro	89,2	95,2	47,91

Figura 2. Determinación de diámetro y altura de las frutas.

En la **Figura 3** se muestran los resultados del efecto del almacenamiento congelado sobre los valores de pH, acidez titulable y grados Brix de todas las muestras ensayadas. En el estado fresco, el pH de los frutos

presentó valores de 5,8 y 5,4 para mamones verdes y maduros, respectivamente, mientras que los pomelos, tanto verdes como maduros, presentaron un valor de pH de 3,2.
En cuanto a los grados Brix, para los pomelos se obtuvieron valores entre 8,1 (verdes) y 9,5 (maduros) y para los mamones entre 5,5 (verdes) y 12,5 (maduros). En este sentido, el contenido de sólidos solubles totales presentó un incremento directamente proporcional al grado de madurez y este efecto fue mayor en los mamones. Este comportamiento puede ser atribuido a la conversión de ácidos orgánicos en azúcares (Rincón et al. 2012) o a la reserva de carbohidratos de la planta por baja capacidad fotosintética del fruto (Ayala et al 2012).

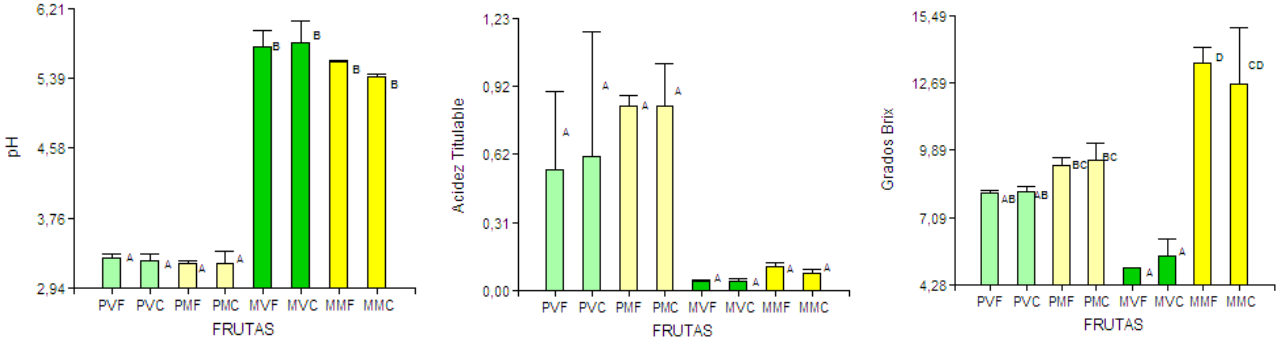


Figura 3. Efecto del almacenamiento congelado sobre los valores de pH, acidez titulable y grados Brix de las frutas en los dos estados de madurez ensayados.

Respecto al efecto de la congelación, la **Figura 3** muestra que tanto el pH como la acidez titulable de ambas frutas no presentaron diferencias significativas luego del almacenamiento a -20°C. Sin embargo, en cuanto al grado de madurez se hallaron diferencias significativas de ratio entre ambas frutas, dando valores mayores en mamones maduros (140 ratios) que en pomelos maduros (11,25 ratios).
La **Figura 4** muestra los resultados obtenidos en la caracterización del color de las cáscaras de los frutos. Como era de esperar por lo determinado visualmente, los pomelos y mamones maduros presentaron valores mayores del parámetro L* asociado a la luminosidad y del parámetro b* asociado al color amarillo, mientras que el parámetro a*(-) asociado al color verde fue mayor para mamones verde-maduros.

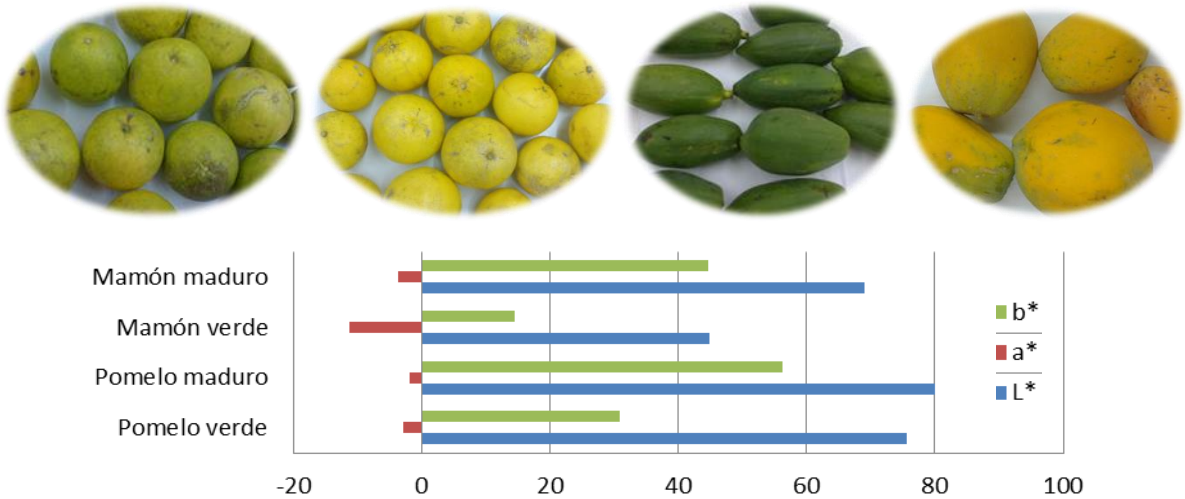


Figura 4. Parámetros de luminosidad L*, a* y b* obtenidos en la determinación del color de las cáscaras de los frutos. Máx. desviación estándar 2,7%.

El almacenamiento congelado disminuyó la luminosidad de las pulpas de los mamones, mientras que este parámetro disminuyó en las pulpas de los pomelos, en ambos estados de madurez (**Fig. 5**). El color de las pulpas se vio afectado por la congelación ya que los mamones verdes y maduros presentaron valores menores de los parámetros a* (asociado al color verdoso) y b* (asociado al color amarillo), respecto a los hallados en los frutos frescos.

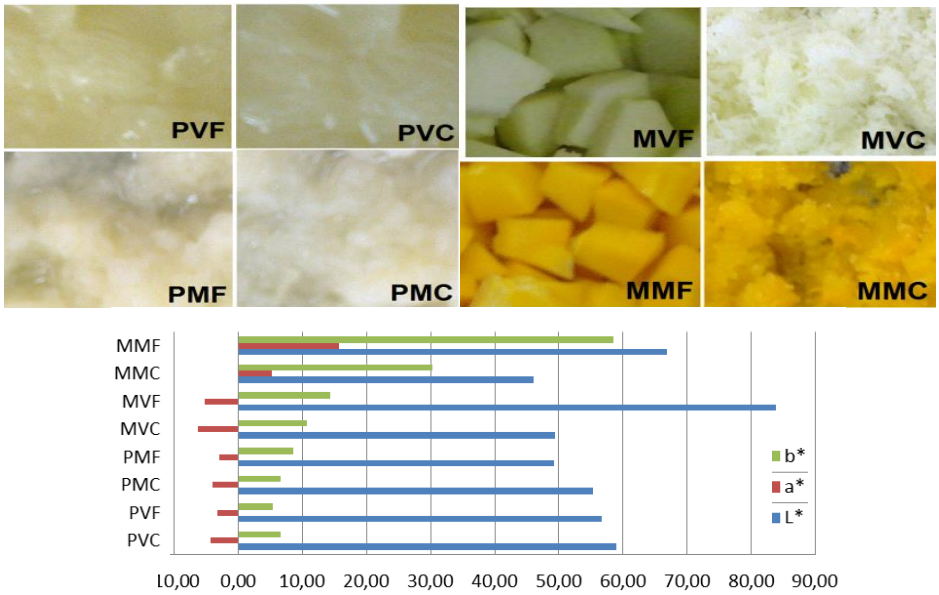


Figura 5. Parámetros de luminosidad L*, a* y b* obtenidos en la determinación del color de las pulpas de los frutos frescos y congelados. Máx. desviación estándar 3,2%.

Análisis de las propiedades de textura de frutos y pulpas

Como se muestra en la **Figura 6**, los perfiles de fuerza de los ensayos de punción fueron similares luego de la congelación en ambos estados de madurez de los pomelos y mamones ensayados. En cambio, la fuerza máxima de punción en los pomelos no varió luego de la congelación, sin embargo aumentó en los mamones maduros y disminuyó en los verdes indicando que el almacenamiento congelado debilitó su estructura. La firmeza puede interpretarse como una respuesta mecánica intrínseca a la estructura de la fruta, esta se ve influenciada por el estado de desarrollo fisiológico, el grado de madurez, daños, fibrosidad y turgencia.

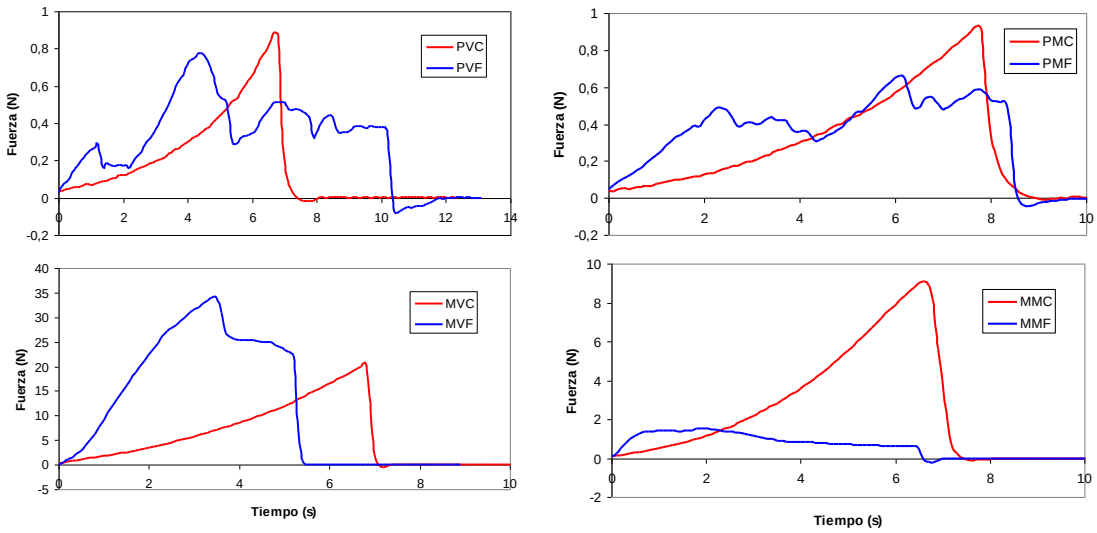


Figura 6, Efecto de la congelación sobre las curvas de Fuerza vs tiempo obtenidas en los ensayos de punción de las pulpas de los frutos en sus dos estados de madurez.

Determinación del contenido de polifenoles totales de los extractos de frutas

Se determinaron fenoles totales en pomelos y mamones frescos y congelados en dos estados de madurez (**Tabla 3**). En ambas frutas el contenido de polifenoles se incrementó con el grado de madurez. En el caso de los mamones maduros, el valor hallado concordó con los valores reportados por Contreras-Calderón et al. (2011), quienes informaron 36,8 mg AG/100 g fruta en la variedad de papaya Mountain. Además, Septembre-Malaterre et al. (2016) analizaron 2 variedades de este tipo de fruta y hallaron valores de 33,4 y 41,3 mg AG/100 g fruta fresca, similares a los obtenidos en el presente trabajo. El contenido de polifenoles determinado en el zumo del pomelo maduro fresco (38,2 mg/100 g fruta fresca ó 78,1/100 ml jugo) fue similar al obtenido por La Cava y Sgroppo (2015), 86,1 mg AG/100 ml de jugo fresco.

Tabla 3. Valores de contenido de fenoles totales de los frutos en los dos estados de madurez ensayados frescos y congelados.

Tipo de fruta	Estado de madurez	Fenoles Totales (mg AG/100 g fruta)	
		Fruta fresca	Fruta congelada
Mamón	Verde-maduro	24,1±0,5	25,6±1,9
	Maduro	31,5±0,3	36,4±0,8
Pomelo	Verde-maduro	34,9±0,3	40,0±0,5
	Maduro	38,2±1,7	47,3±0,2

Luego de la congelación se obtuvieron valores mayores en el contenido de polifenoles de todas las muestras respecto a los determinados en las frutas frescas (**Tabla 3**). Algunos autores han obtenido resultados similares en otras frutas como la arazá (Mejía et al. 2006) sugiriendo que dicho incremento puede ser debido a la generación de compuestos fenólicos libres por acción de enzimas glicosidasas durante el almacenamiento congelado. Otros estudios (Wall et al. 2010) demostraron que los cubos de papaya pueden retener sus compuestos antioxidantes luego de la congelación.

CONCLUSIONES

El método de congelación fue apropiado para mantener la acidez y los grados Brix, como así también las características de textura, de los pomelos y mamones ensayados. Estos resultados sumados al elevado

contenido de antioxidantes conducen a considerar estas frutas preservadas en estado congelado para la elaboración de alimentos de alto valor nutricional. La utilización de pomelos y mamones del norte de nuestro país permitiría obtener alimentos funcionales de bajo costo que potenciarían las economías regionales.

BIBLIOGRAFÍA

Avallone C, Montenegro S, Gruszycki A, Cravzov A. 1997. Mamón (*Carica Papaya*) y sandía (*Citrullus Vulgaris Schrad*) minimamente procesada: Cobertura más favorable para su conservación". Facultad de Agroindustrias, 1: 13-15.

Ayala LC, Valenzuela CP, Bohorquez Y. 2013. Caracterización fisicoquímica de mora de castilla (*Ribus Glaucus Benth*) en seis estados de madurez. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 11: 10-18.

Ayala LC, Valenzuela CP, Bohorquez Y. 2012. Efecto de un recubrimiento comestible a base de alginato de sodio y iones de calcio sobre la calidad de mora de castilla (*Ribus Glaucus Benth*). Facultad de Agronomía. 19: 129-131.

Borneo R, León AE, Aguirre A, Ribotta P, Cantero JJ. 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chemistry, 112(3), 664-670.

Chavez MG, Montiel GM, Sgroppo SC, Avanza JR. 1999. Caracterización del jugo de lima Rangpur (*Citrus Limonia Osbeck*). Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. 1: 1-4.

Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. Food Research International, 44(7), 2047-2053.

Gómez D, Cáez G, Pardo M. 2009. Estudio de los parámetros de color en Papaya (*Carica Papaya*) liofilizada sometida a pretratamientos de deshidratación osmótica. Producción Agroindustrial. 1: 1-6.

Gorinstein S, Cvikrov M, Machackova I, Haruenkit R, Park Y, Jung S, Yamamoto K,Martinez Ayala AL, Katrich E, Trakhtenberg S. 2004. Characterization of Antioxidant Compounds in Jaffa Sweeties and White Grapefruits. Food Chemistry. 84: 503-510.

Jayaprakasha G K, Girennavar B, Patil BS. 2008. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. Food Sc. and Tech. 41: 376-384.

Kaur C, Kapoor H. 2001. Review: Antioxidants in fruits and vegetables: the millennium´s health. International Journal of Food Science and Technology. 36: 703-725.

La Cava EL, Sgroppo SC. 2015. Evolution during refrigerated storage of bioactive compounds and quality characteristics of grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice treated with UV-C light. LWT-Food Science and Technology, 63(2), 1325-1333.

Mejía LJ, Narváez CE, Restrepo LP. 2006. Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). Agronomía Colombiana, 24(1), 87-95.

Pereyra MV, Sgroppo SC. 2006. Cambios en compuestos bioactivos en pomelos mínimamente procesados. Comunicaciones científicas y tecnológicas. 1: 1-5.

Rincón MC, Buitrago Guacaneme CM, Ligarreto Moreno GA; Torres Aponte WS, Balaguera López HE. 2012. Comportamiento del fruto de Agraz (*Vaccinium Meridionale Swartz*) cosechado en diferentes estados de madurez y almacenado en refrigeración. Facultad Nacional de Agronomía. 65: 6621-6631.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. Free Radical Research, 36(2), 177-187.

Septembre-Malaterre A, Stanislas G, Douraguia E, Gonthier MP. 2016. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. Food Chemistry, 212, 225-233.

Sousa MB, Canet W, Alvarez MD, Tortosa ME. 2007. Effect of processing on the texture and sensory attributes of Raspberry (*Cv. Heritage*) and Blackberry (*Cv. Thornfree*). Journal of Food Engineering. 78: 9-

21.
Sun-Waterhouse D. 2011. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. International Journal of Food Science and Technology. 46: 899-920.
Wall MM, Nishijima KA, Fitch MM, Nishijima WT. 2010. Physicochemical, nutritional and microbial quality of fresh-cut and frozen papaya prepared from cultivars with varying resistance to internal yellowing disease. Journal of Food Quality, 33(2), 131-149.

Caracterización de carne de pacú almacenada en congelación a través de medidas de textura y peroxidación lipídica

Forlani L.[1] y Drago S.R.[2].

(1) Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
(2) Instituto de Tecnología de Alimentos, CONICET, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.
sdrago@fiq.unl.edu.armailto:sdrago@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

El pacú es una especie con potencialidad para piscicultura debido a su rápida tasa de crecimiento, fácil adaptación a la alimentación artificial y gran aceptación del consumidor. El objetivo del trabajo fue caracterizar la carne de pacú a través de medidas de textura y peroxidación lipídica luego de 10 y 40 días de congelación. El ensayo de textura se efectuó en carne cruda y cocida mediante pruebas de corte y compresión, empleando un texturómetro TA-XT PLUS. Las variables analizadas fueron Dureza, Modulo de deformación, Masticabilidad, Cohesividad, Gomosidad, Resiliencia y Elasticidad. El grado de peroxidación lipídica se determinó en carne cruda midiendo sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). En carne cruda se observó una disminución de dureza, gomosidad, masticabilidad y módulo de deformación luego de 40 días de congelación. Los niveles de TBARS fueron mayores a mayor tiempo de congelación. En carne cocida, también se observó una disminución de la dureza y del módulo de deformación, particularmente en el ensayo de corte. Se concluye que un período de congelamiento de 40 días produce un impacto en la calidad de la carne que se traduce en un ablandamiento y en un incremento de oxidación de los lípidos.

Palabras claves: pacú, análisis de textura, peroxidación lipídica.

ABSTRACT

Pacú is one of the most promising species for Argentina fish farming because of its fast growth rate, easy adaptation to artificial feeding, and great consumer acceptance. The aim of this work was to characterize pacú meat stored at -20 ºC for a period of 10 and 40 days through texture and lipid peroxidation measurements. The instrumental texture was performed in raw and cooked meat using a TA-XT PLUS texturometer. Samples were subjected to the Texture Profile Analysis and shear test to calculate hardness, deformability module, chewiness, cohesiveness, gumminess, resilience, and elasticity parameters. Lipid peroxidation was measured by means of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. Results showed a decrease of hardness, gumminess, chewiness, and deformation module in raw meat after 40 days of freezing. TBARS levels increased at longer times of freezing. A decrease of hardness and deformability module was observed in cooked meat, particularly in shear test. It is concluded that a period of 40 days freezing produces an impact on meat quality related to a softening and to an increase in lipid peroxidation.

Keywords: pacu, texture analysis, lipid peroxidation.

INTRODUCCIÓN

El Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) es un pez omnívoro que habita los ríos del noreste Argentino. Debido a su rápida tasa de crecimiento y fácil adaptación a la alimentación artificial es una especie con gran potencial para la piscicultura (Jomori et al. 2005). A pesar de la gran aceptación que presenta entre los consumidores,

en nuestro país aún son limitadas las investigaciones relacionadas con la calidad de su carne (Wicki et al. 2004). La frescura es uno de los atributos más importantes cuando se evalúa la calidad en carne de pescado. Diversos factores, como el ambiente, el tipo de alimentación y los cambios postmortem pueden influir en el grado de frescura de su carne (Huss 1995, Cheng et al. 2014). La pérdida de calidad se manifiesta en cambios de composición química, color, apariencia y textura, los cuales tienen relación con la estabilidad y con el procesamiento posterior del producto (Sigurgisladottir et al. 1997, Martinsdóttir et al. 2001, Borges et al. 2013). Diferentes ensayos microbiológicos, químicos y físicos son empleados para evaluar la frescura y posible validez comercial de pescado congelado (Olafsdottir et al. 1997, Olafsdottir et al. 2004, FAO 1997, FAO, 1998).

El grado de oxidación lipídica es un indicador químico muy útil para detectar procesos de deterioro postmortem (Connell 1995, Huss 1995, Mendes et al. 2009). La intensidad con la cual los pescados o productos de la pesca son susceptibles al deterioro lipídico depende principalmente de la cantidad y tipo de lípidos que los constituyen. La elevada proporción de ácidos grasos insaturados presente en los tejidos de los peces predispone a la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento (Huss 1995, Fernández et al. 1997). En carne de pacú, si bien la composición de ácidos grasos está fuertemente influenciada por el hábitat y la dieta, se ha determinado que el perfil lipídico corresponde a un 65% de ácidos grasos insaturados, de los cuales, cerca de un 30% son poli-insaturados (Tanamati et al. 2009). Uno de los productos generados durante la peroxidación es el malondialdehido (MDA), por lo que su cuantificación es indicador muy útil para determinar cambios en la calidad de la carne (Auburg 1993, Angelo 1996).

Entre las propiedades sensoriales, la textura, que refleja las características mecánicas de la carne cuando se somete a una fuerza, es una de las medidas físicas más utilizadas para el estudio de la calidad de carnes de peces (Veland et al. 1999, Torrissen et al. 2001). La textura de la carne de pescado puede determinarse mediante métodos instrumentales o por evaluación organoléptica utilizando paneles de degustación entrenados. El diseño y ejecución de dichos paneles requieren conocimientos y experiencia para obtener resultados fiables. En contraste, los métodos instrumentales son relativamente económicos y si se realizan en condiciones estandarizadas son altamente reproducibles entre lotes y/o laboratorios. Varios métodos instrumentales han sido descritos en base a ensayos de corte, compresión o tracción (Torrissen et al. 2001). Los ensayos de corte implican el uso de una hoja Bratzler Warner o cuchilla para cortar la muestra, mientras se mide la fuerza máxima y el trabajo total realizado. Por otro lado, cuando se realizan las compresiones repetidas de una muestra, es posible comparar los gráficos de fuerza-tiempo de cada compresión para ilustrar el nivel de recuperación de la muestra. Este procedimiento, denominado análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés), se basa en la realización de dos ciclos de compresión-descompresión, imitando así el proceso de masticación (Bourne 1978, Veland y Torrissen 1999). Las diferentes técnicas permiten la determinación de diferentes parámetros, que difieren con respecto a su repetitividad, sensibilidad, y el grado de la correlación con los análisis sensoriales (Thomas et al. 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de congelamiento en la calidad de carne de pacú cruda y cocida a través de medidas instrumentales de textura y del grado de peroxidación lipídica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

El estudio se efectuó en una muestra de pacú eviscerada, provista por un frigorífico de la región. La muestra fue seccionada en cortes transversales de aproximadamente 2,5 cm y se almacenó a -20^{0}C durante 40 días. Para los análisis se utilizó el tejido muscular dorsal localizado entre la aleta pectoral y caudal (Borges et al. 2014). Las piezas a evaluar fueron descongeladas a 4ºC, 12 h previas a las evaluaciones. Se realizaron evaluaciones a los 10 y 40 días postmortem. La textura se determinó en cortes crudos y cocidos. La cocción se realizó en una Plancha Eléctrica Black & Decker Ig 201 que fue calentada a 170ºC. Los cortes se mantuvieron 4 min de un lado, se dieron vuelta y se cocinaron 2 min más, alcanzándose una temperatura interna de 60ºC.

Análisis de textura

Las medidas de textura se determinaron mediante análisis de corte y compresión a velocidad constante (2 mm/s) utilizando un texturómetro TA-TX plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK), equipado con una celda de carga de 5 kg y controlado por el software Exponent Stable Micro Systems.
El test de corte se realizó en piezas de 3 x 1 x 1 cm de largo, ancho y espesor, respectivamente, utilizando una hoja Wagner- Bretzler de 1,1 mm de espesor, 60 mm alto, 45 mm de ancho y con ángulo de apertura de 60°. A partir de un gráfico de fuerza vs. tiempo se determinaron los valores de Dureza (D) y Módulo Deformación (MD).
El ensayo de compresión se realizó con un cilindro de 2 cm de diámetro, en piezas con un tamaño aproximado de 1 cm^3. Los cortes fueron comprimidos en un 50% de forma transversal en relación a las fibras musculares (Thomas et al. 2010). A partir del los gráficos de fuerza vs. tiempo se determinaron los valores de Dureza (D), Modulo Deformación (MD), Masticabilidad (M), Cohesividad (C), Gomosidad (G), Resiliencia (R) y Elasticidad (E) de acuerdo a Buerne et al., (1978) y Veland y Torrissen, (1999). El MD fue calculado a partir del gradiente de la línea trazada desde el tiempo cero hasta el punto más alto de fuerza en la curva (N/s) (Thomas et al. 2010). Cada ensayo fue realizado en al menos 5 piezas.

Determinación del grado de lipo-peroxidación

El grado de oxidación de los lípidos se determinó sólo en piezas crudas. Fue estimado a través de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege et al. 1978). El índice de TBARS se expresó como nmolMDA/g de músculo. Los análisis fueron realizados por triplicado de muestra.

Análisis estadísticos

Los resultados se analizaron mediante Análisis de Varianza simple (ANOVA). En aquellos casos en los cuales se observaron diferencias estadísticamente significativas, se utilizó el test LSD para realizar comparaciones múltiples. Los análisis fueron realizados empleando el software STATGRAPHICS Centurión XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La textura de la carne de pacú fue analizada usando dos métodos instrumentales diferentes. Los resultados del análisis de perfil de textura (TPA) y del test de corte en muestras crudas se muestran en las **Tablas 1** y **2**.

En carne cruda, los dos métodos mostraron una significativa disminución en las medias de D y MD a 40 días respecto a 10 días de almacenamiento. Además, el test de compresión arrojó valores significativamente menores de gomosidad y masticabilidad en las muestras congeladas por 40 días. Estos resultados indican un ablandamiento del tejido muscular debido al tiempo de congelamiento, sugiriendo una pérdida de calidad de la carne. El proceso de congelación y el almacenamiento en congelación producen desnaturalización de las proteínas del músculo de pescado. La pérdida de firmeza del pescado que ha sido congelado sería producto de la destrucción parcial de colágeno, así como cambios en el citoesqueleto y en las proteínas miofibrilares (Cheng et al. 2014). Las modificaciones que sufren las proteínas estarían promovidas por la formación de cristales, la deshidratación y el aumento de las concentraciones de sales originado durante la congelación (Soliman y Shenouda 1980). El ablandamiento de la carne de pescado con el tiempo de congelamiento ha sido reportada en especies como el salmón Atlántico (Sveinsdóttir et al. 2002), trucha arcoíris (Ando et al. 1991) y salmón rey (Fletcher et al. 2003), así como en otras especies empleadas en acuicultura (Alasalvar et al. 2001, Hernández et al. 2009, Borges et al. 2014).

Tabla 1. Análisis de perfil de textura (TPA) en carne de pacú cruda para dos tiempos de congelación a -20ºC.

	Tiempo de congelación (días)	
Parámetros*	**10**	**40**
Dureza (*N*)	3,14 ± 0,73[a]	0,66 ± 0,16[b]
Cohesividad	0,67 ± 0,01[a]	0,77 ± 0,04[b]

Gomosidad (*N*)	2,12 ± 0,44[a]	0,52 ± 0,17[b]
Elasticidad	0,99 ± 0,01[a]	0,99 ± 0,01[a]
Resiliencia	0,26 ± 0,01[a]	0,37 ± 0,02[b]
Módulo de Deformación (*N/s*)	1,33 ± 0,41[a]	0,60 ± 0,15[b]
Masticabilidad (*N*)	2,12 ± 0,49[a]	0,52 ± 0,16[b]

*media ± desvío estándar (n= 5). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (p < 0,01).

A diferencia de los demás parámetros, se observó que la cohesividad y la resiliencia aumentaron significativamente a los 40 días de congelamiento. No se observaron diferencias significativas en la elasticidad de la carne entre los dos tiempos de congelación evaluados. Tanto la cohesividad, la resiliencia, como la elasticidad son parámetros adimensionales que describen la capacidad del tejido para recuperarse de la deformación y ofrecer resistencia en sucesivos ciclos de compresión-descompresión. Sin embargo, es importante mencionar que ninguno de ellos permite cuantificar la fuerza requerida para alcanzar estas deformaciones, por lo que no dan información acerca de la firmeza del tejido (Veland y Torrissen 1999).

Tabla 2. Test de corte en carne de pacú cruda para dos tiempos de congelación a -20ºC.

	Tiempo de congelación (días)	
Parámetros	**10**	**40**
D(*N*)	3,85 ± 1,01[a]	2,38 ± 0,43[b]
MD(*N/s*)	0,60 ± 0,03[a]	0,29 ± 0,01[b]

*media ± desvío estándar (n= 5). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (p < 0,01).

Respecto a los análisis de textura efectuados en carne cocida, el test de compresión resultó limitado para describir cambios en la textura, ya que de todos los parámetros analizados, sólo se observaron diferencias significativas en el valor del módulo de deformación (**Tabla 3**). Éste es un parámetro relacionado con la elasticidad e indica la capacidad del tejido para resistir la deformación, tanto en términos de fuerza como de velocidad (Johnson et al. 1980, Thomas et al. 2010). A través de este análisis se observó un aumento de 2,9 veces en el valor medio del MD entre los dos tiempos de congelación.

Los resultados del test de corte para carne cocida mostraron una significativa reducción de la dureza, así como también del MD a los 40 días de almacenamiento (**Tabla 4**). Otras investigaciones efectuadas en carne de pescado han sugerido que el test de corte presenta una mayor sensibilidad para detectar cambios en la textura del músculo (Thomas et al. 2010). Trabajos efectuados con salmón comparando diferentes técnicas de textura concluyeron que el método de corte conlleva una mayor sensibilidad para predecir la textura post-cocción en relación a la textura de muestras crudas y para detectar diferencias de textura relacionadas con la ubicación del filete en el cuerpo del pez (Sigurgisladottir et al. 1997, Sigurgisladottir et al. 1999, Thomas et al. 2010). Asimismo, Borderıas et al. (1983) encontraron una correlación positiva entre la dureza sensorial y la determinada por el test de corte en filete crudos de 5 especies diferentes de peces marinos.

Tabla 3. TPA en carne cocida para dos tiempos de congelación a -20ºC.

	Tiempo de congelación (días)	
Parámetros*	**10**	**40**
Dureza (*N*)	9,04 ± 1,60[a]	10,56 ± 2,25[a]
Cohesividad	0,50 ± 0,07[a]	0,48 ± 0,05[a]
Gomosidad (*N*)	4,25 ± 0,68[a]	5,01 ± 0,87[a]

Elasticidad	0,99 ± 0,01[a]	0,99 ± 0,01[a]
Resiliencia	0,19 ± 0,04[a]	0,23 ± 0,03[a]
Módulo de Deformación (*N/s*)	3,57 ± 0,63[a]	10,27 ± 2,19[b]
Masticabilidad(*N*)	4,25 ± 0,68[a]	5,00 ± 0,87[a]

*media ± desvío estándar (n= 5). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (p < 0,01).

El mayor grado de sensibilidad del método podría ser debido a que las sondas de corte, a diferencia de la sonda de compresión, deben atravesar toda muestra, con lo cual, las modificaciones producidas durante la congelación y/o cocción tanto sobre el tejido conectivo, como en el tamaño y la densidad de las fibras musculares (Ayala et al. 2005) tendrían un mayor impacto en las mediciones de corte (Thomas et al. 2010, Veland y Torrissen 1999).

Tabla 4. Test de corte en carne cocida para dos tiempos de congelación a -20ºC.

	Tiempo de congelación (días)	
Parámetros	**10**	**40**
D(*N*)	14,50 ± 4,96 [a]	6,78 ± 1,85 [b]
MD(*N/s*)	1,16 ± 0,32 [a]	0,74 ± 0,17 [b]

*media ± desvío estándar (n= 5). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (p < 0,01).

En la **Tabla 5** se muestra el contenido de MDA de los tejidos a 10 y 40 días de almacenamiento a -20ºC. Se determinó que los niveles de MDA se incrementaron aproximadamente 1,4 veces entre ambos tiempos. El aumento en la concentración de MDA estaría indicando que los lípidos del músculo de pacú sufrieron oxidación con el tiempo de almacenamiento. Se ha demostrado que a mayores tiempos de congelación se incrementa la cantidad de ácidos grasos libres y los procesos oxidativos (Aubourg et al. 1999, Aubourg et al. 2005). Por otro lado, se ha sugerido que los productos de la oxidación de los lípidos podrían interaccionar con las proteínas estructurales del músculo, contribuyendo a su desnaturalización, lo que a su vez afecta las propiedades mecánicas del tejido (Sarma et al. 2000, Tironi et al. 2002). Estos resultados indican que la oxidación de los lípidos fue acompañada por una disminución de la firmeza de la carne. Otras investigaciones han correlacionado los aumentos en la oxidación de los lípidos con una pérdida de calidad de la carne a mayores tiempos de congelamiento. En pacú, Borges et al. (2014) determinaron que un incremento en los niveles de MDA en músculo almacenado a -2°C durante más de dos semanas se asoció a una marcada disminución de la dureza. Barón et al. (2007) comprobaron en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), alteraciones en lípidos y proteínas del pescado congelado durante un periodo de conservación de 13 meses a - 20ºC. Así mismo, en el pez corvina (*Argyrosomus regius*), una especie muy comercializada en la Unión Europea, se observó una correlación entre la disminución de la dureza y niveles de MDA en tejidos con 18 días de almacenamiento a 4°C (Hernández et al. 2009). Resultados similares fueron obtenidos en trabajos realizados en músculo de distintas especies de salmónidos (Aubourg et al. 2005, Rodriguez et al. 2007, Tironi et al. 2010). En base a las diferencias observadas en el contenido de MDA entre los dos períodos de almacenamiento, se puede considerar a este parámetro como un buen índice de deterioro para carne de pacú.

Tabla 5. Niveles de MDA en carne cruda congelada a -20ºC.

	Tiempo de congelación (días)	
	10	**40**
Concentración de MDA (nmol MDA/g)	23,52 ± 1,19[a]	32,31 ± 2,61[b]

Por otra parte, estos valores corresponden a concentraciones de 1,70 ± 0.09 y 2,33 ± 0,19 mg MDA/kg. De acuerdo a lo propuesto por Connell (1995), concentraciones de MDA del orden de los 1–2 mg MDA/kg podrían estar asociadas a una mayor pérdida de calidad del producto, debido a que el pescado presentará un olor y sabor objetables. Dado que en principio no se detectaron olores desagradables, sería importante realizar estudios sensoriales y establecer los límites de MDA que correlacionan con deterioro sensorial para carne de pacú.

CONCLUSIONES

El análisis de textura indicó que 40 días de congelación son suficientes para producir un impacto en las

propiedades mecánicas de la carne de pacú. En las muestras crudas, las alteraciones se vieron reflejadas en una disminución de dureza, gomosidad, masticabilidad y en el valor del módulo de deformación. Estos cambios fueron detectados tanto por el test de corte como el ensayo de TPA. Por su parte, en carne cocida, el método de corte presentó más sensibilidad para detectar la disminución de la dureza entre los dos tiempos de almacenamiento.

El ablandamiento observado en la carne también fue acompañado por un significativo aumento de la oxidación de los lípidos, lo que estaría indicando una pérdida de calidad del producto. En base a los resultados obtenidos, sería importante realizar una evaluación sensorial para establecer la relación entre las variables medidas objetivamente con las detectadas por un panel sensorial.

BIBLIOGRAFÍA

Alasalvar C, Taylor K, Öksüz A, Garthwaite T, Alexis MN , Grigorakis K. 2001. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. Food Chemistry, 72: 33–40.

Ando M, Totohara H, Shimizu Y, Sakaguchi M. 1991. Post-mortem tenderisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle caused by gradual disintegration of the extracellular matrix structure. Journal of the Science of Food and Agriculture, 55:589-597.

Angelo AJ. 1996. Lipid oxidation in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36: 175–224.

AOAC. 2000. Official methods of analysis (17th Ed.). Gaithersburg, Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Aubourg S, Rey-Mansilla M, Sotelo C. 1999. Differential lipid damage in various muscle zones of frozen hake (Merluccius merluccius). LWT- Z. Lebensm. Unters. Forsch, 208:189-193.

Aubourg S, Vinagre J, Rodríguez A, Losada V, Larraín M A, Quitral V, Gómez J, Maier L, Wittig E. 2005. Rancidity development during the chilled storage of farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). European Journal of Lipid Science and Technology, 107: 411-417.

Auburg SP. 1993. Review: interaction of malonaldehyde with biological molecules - new trends about reactivity and significance International Journal of Food Science and Technology, 28:323–335

Ayala MO, Lopez Albors A, Blanco A, Garcıa Alcazar E, Abellan G, Ramírez Zarzosa F. 2005. Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*), after cooking and freezing. Aquaculture, 250: 215– 231.

Baron C P, Kjærsgård I H, Jessen F, Jacobsen C. 2007. Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss).* Journal of Agriculture Food Chemistry, 55: 8118-8125.

Borderıas AJ, Lamua M, Tejada M. 1983. Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. Journal of Food Technology, 18: 85–95.

Borges A, Conte-Junior CA, Franco RM, Freitas MQ. 2014. Quality parameters of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) gutted and stored on ice for different periods. International Food Research Journal, 21(2): 589-596.

Borges A, Conte-Junior CA, Franco RM, Freitas MQ. 2013. Quality Index Method (QIM) developed for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and determination of its shelf life. Food Research International, 54: 311–317.

Bourne MC. 1978. Texture profile analysis. Food Technology, 32:62–66.

Cheng Jun-Hu, Sun Da-Wen, Zhong Han, Xin-An Zeng. 2014. Texture and Structure Measurements and Analyses for Evaluation of Fish and Fillet Freshness Quality: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol.13.

Chytiri S, Chouliara I, Savvaidis IN, Kontominas MG. 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. Food Microbiology, 21: 157–165

Connell JJ. 1995. Control of Fish Quality (4th ed.).Fishing News Books Limited, London.

FAO. 1997. Traditional microbiological quality control. In H. H. Huss (Ed.), Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Documento técnico de pesca 334. (Chapter 4). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/FAO).

FAO. 1998. El Pescado Fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO. Documento Técnico de Pesca 348. Editado por H.H. Huss, Laboratorio Tecnológico, Ministerio de Pesca Dinamarca, 1998. http://www.fao.org/docrep/V7180S/v7180s00.html.

Fernández J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J A. 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chemistry, 59: 345–353.

Fletcher GC, Corrigan VK, Summers G, Leonard MJ, Jerrett AR, Black SE. 2003. Spoilage of rested harvested king salmon (Oncorhynchus tshawytscha). Journal of Food Science, 68:2810-2816.

Hernández MD, López MB, Álvarez A, Ferrandini B, García A, Garrido MD. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. Food Chemistry, 114: 237–245.

Huss HH. Quality and Quality Changes in Fresh Fish, FAO Fisheries Technical Paper, 1995. vol. 348, FAO, Rome.

Johnson EA, Segars RA, Kapsalis J, Normand MD, Peleg M. 1980. Evaluation of the compressive deformability modulus of fresh and cooked fish flesh. Journal of Food science, 45:88-89

Jomori RK, Carneiro DJ, Martins M, Portella MC. 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. Aquaculture, 243:175-183.

Martinsdóttir E, Sveinsdóttir K, Luten J B, Schelvis-Smit R, Hyldig G. 2001. Reference manual for the fish sector: sensory evaluation of fish freshness. The Netherlands: QIM Eurofish.

Mendes R, Cardoso C, Pestana C. 2009. Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. Food Chemistry, 112:1038–1045

Olafsdottir G, Nesvadba P., Di Natale C., Careche M., Oehlenschlager J. 2004. Multisensors for fish quality determination. Trends in Food Science and Technology, 15:86–93

Olafsdóttir G, Martinsdóttir E, Oehlenschlager J, Dalgaard P, Jensen B, Undeland I. 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science & Technology, 8:258–265.

Olafsdottir G, Nesvadba P, Di Natale C, Careche M, Oehlenschlager J, Tryggvadottir SV. 2004. Multisensors for fish quality determination. Trends in Food Science and Technology, 15:86–93

Rodríguez A, Losada V, Larraín MA, Quitral V, Vinagre J, Aubourg S P. 2007. Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed Coho salmon (Oncorhynchus kisutch). J. Amer. Oil Chem. Soc., 84:727-734.

Santana L S, Mancini-Filho J. 2000. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. Food Chemistry, 68:175–178.

Sarma J, Vidya Sagar Reddy G, Srikar LN. 2000. Effect of frozen storage on lipids and functional properties of proteins of dressed Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*). Food Research International, 33: 815-820.

Sigurgisladottir S, Hafsteinsson H, Jonsson A, Lie O, Nortvedt R, Thomassen M, Torrissen O. 1999. Textural properties of raw salmon fillets as related to sampling method. Journal of Food Science, 64:99–104.

Sigurgisladóttir S, Torrissen O, Lie O, Thomassen M, Hafsteinsson H. 1997. Salmon quality: Methods to determine the quality parameters. Reviews Fish Science, 5:1-30.

Soliman Y, Shenouda K. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. Advances in Food Research, vol. 26.

Tanamati A, Flávia B, Stevanato J, Visentainer E, Matsushita M, Evelázio de Souza N, Visentainer J. 2009. Fatty acid composition in wild and cultivated pacu and pintado fish. European Journal of Lipid Science and Technology, 111: 183–187.

Thomas J A, Ian M, Ian A J. 2010. A Novel Tensile Test Method to Assess Texture and Gaping in Salmon Fillets. Journal of Food Science, 75:4-7.

Tironi VA, Tomás M, Añón MC. 2002. Structural and functional changes in myofibrillar proteins of sea salmon (*Pseudopercis semifasciata*) by interaction with malondialdehyde (RI). Journal of Food Science, 67: 930–935.

Tironi V, Tomás M, Añón MC. 2010. Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudopercis semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract. Food Science and Technology, 43: 263–272.

Torrissen O, Sigurgisladottir S, Slinde E. 2001. Texture and technological properties of fish. In: Kestin SC, Warriss PD, editors. Farmed fish quality. Oxford, U.K. Fishing News Books. 42–57.
Torrissen O, Sigurgisladottir S, Slinde E. 2001. Farmed fish quality. Texture and technological properties of fish.Oxford, U.K. Fishing News Books. 42–57.
Veland JO, Torrissen OJ. 1999. The texture of Atlantic salmon (Salmo salar) muscle as measured instrumentally using TPA and Warner Bratzler test. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79:1737–46.
Wicki G, Luchini L. 2004. Development of practical diets for Pacú. A South American freshwater fish species. International Aquafeed, 7:23-29.

AGRADECIMIENTOS
Financiado por ANPCYT Proyecto PICT 1804.

Utilización de pétalos de rosa como insumo en la industria de alimentos

Gabilondo, J (1); Schelegueda, L.I (3,4); Campos, C.A (3,4); Carduzza, F (2); Langman, L.E (2); Soteras, T (2); Arroyo, L. (1), Corbino, G (1)

(1) Estación Experimental Agropecuaria (EEA) San Pedro – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
(2) Instituto de Alimentos (ITA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INTA.
(3) Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
(4) CONICET, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron: i) determinar el contenido de fenoles totales (FT), las actividades antioxidante (AA) y antimicrobiana en pétalos de diversas variedades de la zona; ii) evaluar la aceptabilidad sensorial de infusiones obtenidas con pétalos de las mismas variedades; y iii) determinar el contenido de FT y AA de las infusiones evaluadas. Las variedades evaluadas fueron *Kardinal (*K*), Gran Gala (*GG*), Cristóbal Colón (*CC*); Bella época* (BE) y *King Rawson (*KR). Las variedades K y GG presentaron mayor contenido de FT y AA con diferencias significativas ($p<0.05$) al resto. Estas también mostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces balli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shewanella. putrefaciens*. K, además, fue efectiva frente a *Listeria innocua*. Las infusiones de K, BE y CC mostraron una mayor aceptabilidad global ($p<0.05$) mientras que la infusión de KR fue la de menor aceptabilidad. En cuanto a la puntuación por atributos, no hubo diferencias significativas en el olor de todas las infusiones evaluadas pero sí en color, siendo GG y K las de mayor puntuación; y en sabor, KR presentó la menor aceptabilidad. Las infusiones elaboradas con GG y K fueron las de mayor AA y FT, incluso con diferencias significativas al té verde.

Palabras claves: flores comestibles, antioxidantes, infusiones, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The objectives of this study were: i) to determine the content of total phenols (TP), the antioxidant (AA) and antimicrobial activities in fresh petals of different varieties of the area; ii) to evaluate the sensory acceptability of infusions obtained with dried petals of the same varieties; and iii) to determine the content of TP and AA in infusions evaluated. Evaluated varieties were *Kardinal* (K), *Gran Gala* (GG), *Cristóbal Colón* (CC); *Bella Epoca* (BE) and *King Rawson* (KR). K and GG presented higher content of TP and AA with significant differences ($p <0.05$) from the rest. These also showed ability to inhibit the growth of *Zygosaccharomyces Balli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Shewanella putrefaciens*. K also was effective against *Listeria innocua*. Infusions of K, BE and CC showed greater global acceptability ($p <0.05$) while KR infusion exhibited lower acceptability. Regarding the score for attributes, there were no significant differences in the odor of all infusions evaluated but the color showed significant differences being GG and K the ones with the highest score. KR presented the lower acceptability in taste. Infusions made with GG and K showed the higher values in AA and TP, even with significant differences to green tea.

Key words: edible flowers, antioxidants, infusions, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

En San Pedro, provincia de Buenos Aires, el cultivo de rosas es una actividad característica dentro del sistema de producción de plantas de vivero. Se cultivan alrededor de 150 hectáreas, que representan aproximadamente el 16% de la superficie destinada a vivero en el área, distribuidas en más de 100 viveros

de diferentes estratos productivos y sociales, con una producción anual estimada de 1 millón de plantas comerciales (Hansen 2007). Estas especies se venden bajo la modalidad de planta ornamental en maceta o a raíz desnuda. Durante su período de producción, hasta obtener un tamaño comercial, se producen varias floraciones, dejando el material secarse a campo. Las flores descartadas podrían ser aprovechadas en la industria alimentaria. Diversas flores, como las amapolas, rosas, claveles, azahares, crisantemos, malvas, pensamientos, jazmín, gladiolos, salvia o violetas se utilizan desde tiempos remotos en la preparación de alimentos. Las flores comestibles suelen utilizarse en infusiones, tortas, ensaladas, postres, bebidas e innumerables comidas (Barash 1998, Mlcek y Otakar 2011). En países como China, Méjico y Brasil han mantenido estos condimentos en la cocina tradicional, por sus cualidades medicinales y propiedades saludables (Kumar *et al*. 2009). Debido a que la mayoría de las flores de estas especies, presentan colores intensos y atractivos, agregarían valor *per se*, en estos alimentos, además de aportar nutrientes, vitaminas y compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, antocianinas y carotenoides. Estos últimos poseen actividad antioxidante y están asociados a un impacto positivo en la salud humana por contrarrestar los efectos del estrés oxidativo. Además, estos ejercen un amplio rango de actividades biológicas como antimicrobianos, anti-inflamatorios, antisépticos, inmuno-supresivos y actividad pre biótica entre otras (Bernal *et al*. 2011, Liu 2013, Rajeshwari *et al*. 2014, De Ancos *et al*. 2015). Además sólo pueden ser obtenidos de la dieta ya que no son sintetizados por el organismo.

Los objetivos del presente trabajo fueron: determinar el contenido de fenoles totales (FT), las actividades antioxidante (AA) y antimicrobiana en pétalos de distintas variedades de rosa - *Kardinal (K)*, *Gran Gala (GG)*, *Cristóbal Colón (CC)*; *Bella época* (BE) y *King Rawson (KR)* - ; y evaluar la aceptabilidad sensorial, la AA y el contenido de FT de infusiones obtenidas con pétalos secos de las mismas variedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras vegetales frescas

Se trabajó con cinco variedades de *rosa híbridas de té*, de distinto color de pétalo. Las variedades utilizadas fueron *Bella Época (Color rosa)*, *King Rawson (Color amarillo)*, *Kardinal (Color rojo brillante)*, *Gran Gala (Color rojo oscuro)* y *Cristóbal Colón.(Color naranja).*Se tomaron muestras de flores abiertas de 3 cosechas por cultivar. Se separaron los pétalos y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas fueron liofilizadas, trituradas y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Preparación de los extractos etanólicos

Cada muestra liofilizada (aprox. 0,5 g) se mezcló con etanol 96° durante 30 minutos en agitación a 25°C y se almacenó a 4 ± 1 °C durante 24 hs. El sobrenadante se separó por centrifugación, 10 minutos a 6000 rpm y 4 ± 1 °C y se pasó a un tubo estéril. Luego, se utilizó para la determinación de la actividad antimicrobiana, la AA y el contenido de FT.

Muestras vegetales deshidratadas

Se trabajó con las variedades mencionadas anteriormente: *Bella Época*, *King Rawson*, *Kardinal*, *Gran Gala* y *Cristóbal Colón.* Se realizaron cosechas semanales de flores abiertas durante toda la campaña (Octubre 2014 - marzo 2015). Se separaron los pétalos y se secaron sobre camastros en cámara 30 °C con corriente de aire. Se mantuvieron allí hasta que su textura fuera quebradiza y luego se almacenaron a -60 °C hasta la elaboración del té.

Preparación de las infusiones

Las infusiones se prepararon siguiendo la metodología de Vanderjagta *et al*. (2002) con algunas modificaciones. En vasos de precipitado se colocaron 20 g de pétalos secos por litro de agua filtrada a 80 ± 2 °C, manteniéndose la temperatura en baño termostático con agitación suave por 10 minutos y luego se filtraron los pétalos. Las infusiones se utilizaron para el análisis de aceptabilidad del consumidor y las determinaciones de AA y contenido de FT.

Métodos analíticos

La *humedad* se determinó por secado de la muestra en estufa a 100°C por 24 hs (AOAC 1960).

Determinación de fenoles totales: Se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteau de acuerdo al método de

Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones, utilizando ácido clorogénico como estándar. A 250 µL de extracto se le agregaron 4 ml de agua destilada y 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteau. Luego de 3 minutos, se incorporaron 500 µL de Na_2CO_3 1N, se mantuvo 120 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La curva estándar se realizó utilizando concentraciones de ácido clorogénico desde 75 hasta 400 mg/L. El contenido total de polifenoles se informó como mg de ácido clorogénico por g base seca (bs). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de la actividad antioxidante: Cada extracto se analizó por triplicado mediante la reducción del radical DPPH· de acuerdo al método de Brand-Williams *et al*. (1995). A 400µl de extracto se le agregaron 3,6 ml de DPPH· 0,1 mM, se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La AA se calculó usando una curva estándar con concentraciones de TROLOX desde 20 µM hasta 450 µM. Los resultados se expresaron como mg equivalentes TROLOX por g bs.

Determinación de la actividad antimicrobiana: Se evaluó la posible acción de los extractos para inhibir el desarrollo de microorganismos de colección que se asocian al deterioro de alimentos (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Shewanella putrefaciens* ATCC 8071, *Zygosaccharomyces bailii NRRL 7256)* y de *Listeria innocua* ATCC 33090 como alternativa al patógeno *Listeria monocytogenes*. La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó mediante el método de difusión en agar. Para ello, se inoculó agar al 1,2% con 10^6 UFC/ml de los cultivos indicadores. En el caso de las bacterias se utilizó agar Mueller Hinton y en el de *Z. bailii*, agar Sabouraud. Se vertieron 20 ml del agar inoculado en placas de Petri. Cuando el agar estuvo solidificado, se formaron pocillos de 6 mm de diámetro, utilizando un sacabocados. Se colocaron 50 µl de extracto en cada pocillo. Las placas se incubaron a 4 ± 1ºC por 2 horas para facilitar la difusión en el agar y luego a 30°C por 24 horas. En un pocillo se colocó etanol, para descartar su posible acción inhibitoria. Luego de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición. Una vez verificada la acción antimicrobiana de los extractos, se procedió a determinar los títulos de los mismos, para ello, se repitió el procedimiento previamente descripto, sembrando en los pocillos sucesivas diluciones de los extractos.

Evaluación de la aceptabilidad del consumidor

El ensayo de aceptabilidad se realizó en el mes de marzo de 2015. Se reclutaron 100 personas que asiduamente bebieran infusiones, representadas por hombres y mujeres en un rango de edad entre 18 y 60 años, de distintos Institutos de Investigación del INTA Castelar. Con el objetivo de evaluar sólo la preferencia de las infusiones entre cultivares, no se ofreció ningún edulcorante ni alimento. Se entregó cada una de las variedades de té en un vaso térmico con tapa conteniendo aprox. 25 ml de infusión. Las muestras fueron entregadas a los evaluadores en orden aleatorio codificadas con números de tres dígitos al azar. Se evaluaron color, olor, sabor y aceptabilidad global utilizando para cada caso una escala hedónica lineal no estructurada con tres anclas (me disgusta extremadamente, no me gusta ni me disgusta y me gusta extremadamente) (Lawless 2010).

Análisis estadísticos

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se efectuó mediante prueba DGC utilizando el programa InfoStat versión 2013.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pétalos frescos

Fenoles totales

En la **Figura 1** puede observarse el contenido de FT en pétalos frescos de las variedades de rosa: *King Rawson*, *Bella Época*, *Cristóbal Colón*, *Gran Gala* y *Kardinal*. Del mismo modo que lo hallado en las infusiones, *Gran Gala* y *Kardinal* presentaron los mayores ($p < 0,05$) valores siendo 49,9 y 52,5 mg ácido clorogénico / g bs respectivamente. *Bella Época* y *Cristóbal Colón* no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sí hallándose 19,8 y 20,4 mg ácido clorogénico / g bs respectivamente. *King Rawson* fue la

variedad de menor contenido (15,8 mg ácido clorogénico / g bs). Algunos investigadores, en china, analizaron el contenido de fenoles totales de 10 especies diferentes de flores comestibles y los resultaron indicaron que éstas son una muy buena fuente de compuestos fenólicos (Xiong *et al.* 2014). Por otro lado, Li *et al.* (2014) evaluaron también los fenoles totales de 51 especies de flores silvestres y comestibles y hallaron que *rosa híbrida* fue la que presentó el mayor contenido de estos compuestos.

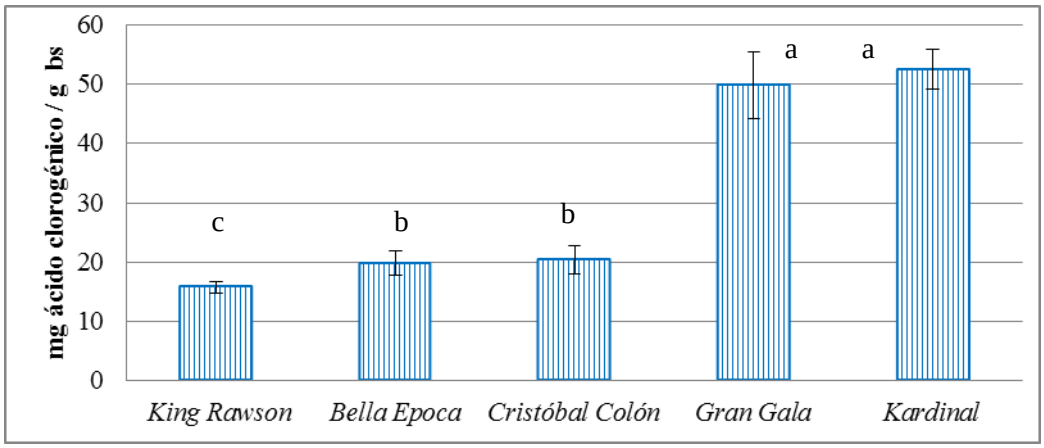


Figura 1. Contenido de fenoles totales en pétalos frescos de distintas variedades de rosa. (Resultados expresados en mg ácido clorogénico / g bs).
Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Actividad antioxidante

En la **Figura 2** se muestra la actividad antioxidante de las variedades *King Rawson, Bella Epoca, Cristóbal colón, Gran Gala y Kardinal*. Las variedades de mayor actividad antioxidante fueron *Gran Gala* (56,0 mg TROLOX / g bs) *y Kardinal* (54,9 mg TROLOX / g bs), ambas de pétalos color rojo, sin diferencias significativas (p > 0,05) entre sí. Le siguen, aunque con valores muy inferiores a las anteriores, *Cristóbal Colón* (27,8 mg TROLOX / g bs), *Bella época* (24,7 mg TROLOX / g bs) y *King Rawson* (11,9 mg TROLOX / g bs). Del mismo modo que lo hallado en este trabajo, Benvenuti *et. al* (2016) reportaron que las flores comestibles de color rojo son asociadas a altos valores de AA y aquellas de colores claros como el blanco y amarillo, a baja AA. Otros estudios han reportado que extractos metanólicos de *Rosa chinensis* exhibieron altos niveles de AA y aproximadamente cincuenta veces más que los extractos de tomate, brócoli, o de manzana (Cai *et al.* 2005) y más que en otras plantas medicinales (Mavi *et al.* 2004). A su vez, Friedman *et al* (2007) destacó la importancia de la AA en flores de begonia, rosas y jazmín.

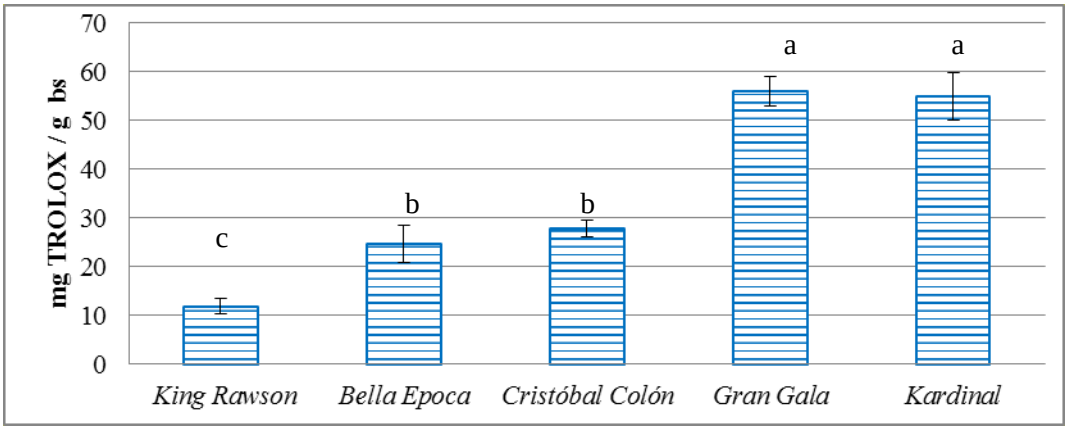


Figura 2. Actividad antioxidante en pétalos frescos de distintas variedades de rosas.

(Resultados expresados como mg TROLOX / g bs).
Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Correlación entre el contenido de FT y la AA de los pétalos frescos

En la **Figura 3** puede observarse la correlación entre el contenido de FT y la AA de los pétalos frescos evaluados. Se halló una alta correlación (R^2= 0,885) entre el contenido de FT y la AA de las muestras analizadas. Del mismo modo que lo observado en las infusiones, estos resultados indicarían que los compuestos fenólicos presentes en las variedades de rosa evaluadas poseen una fuerte contribución a la actividad antioxidante de las mismas. Nuestros resultados están en concordancia con Kaisoon *et al* (2012) quienes hallaron una fuerte correlación de estos compuestos en distintas flores comestibles.

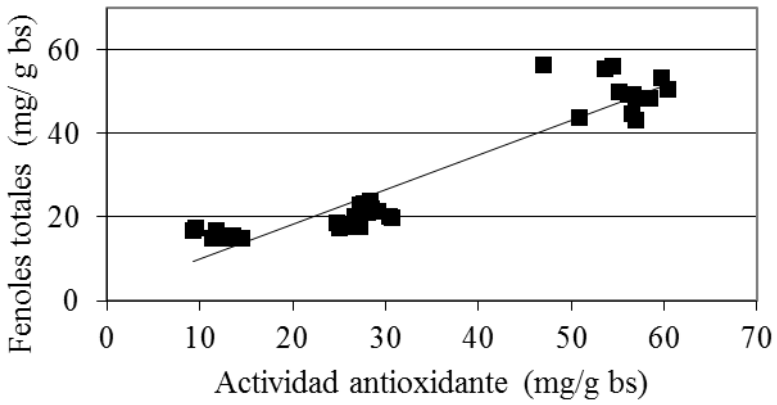


Figura 3. Correlación entre la AA y el contenido de FT de los pétalos frescos.

Actividad antimicrobiana

De los extractos evaluados, las variedades *Kardinal* y *Gran Gala*, ambas de pétalos rojos, mostraron acción antimicrobiana sobre todos los indicadores evaluados. Se pudo verificar que el etanol no ejerció acción inhibitoria. En la **Tabla 1** se detallan los resultados obtenidos, puede apreciarse que la variedad *Kardinal* presenta mayor actividad que *Gran Gala*. Es de destacar que ambas variedades son la que presentaron mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante. Esta tendencia es coincidente con la reportada en bibliografía (China *et al*. 2012).

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición (mm) obtenidos en la determinación de los títulos de los extractos.

	Kardinal				***Gran Gala***			
Cepa indicadora / Diluciones	**1**	**1/2**	**¼**	**1/8**	**1**	**1/2**	**1/4**	**1/8**
Z. bailli	11	10	10	---	11	9	---	---
Ps. aeruginosa	10,5	9	8,5	---	11,5	10,5	---	---
L. innocua	13	11,5	---	---	---	---	---	---
S. putrefaciens	15,5	13	9,5	---	14	11,5	9	---

---no se detecta actividad antimicrobiana

Pétalos deshidratados

Evaluación de la aceptabilidad sensorial de infusiones

En la **Figura 4** se observan los resultados de las evaluaciones de color, olor, sabor y aceptabilidad global

para las cinco infusiones elaboradas con pétalos de rosa de las variedades *King Rawson*, *Kardinal*, *Bella época*, *Gran Gala* y *Cristóbal Colón*.
Las infusiones pertenecientes a las variedades *Kardinal*, *Bella época*, *Gran Gala* y *Cristóbal Colón* mostraron una aceptabilidad general con valores superiores a 5.

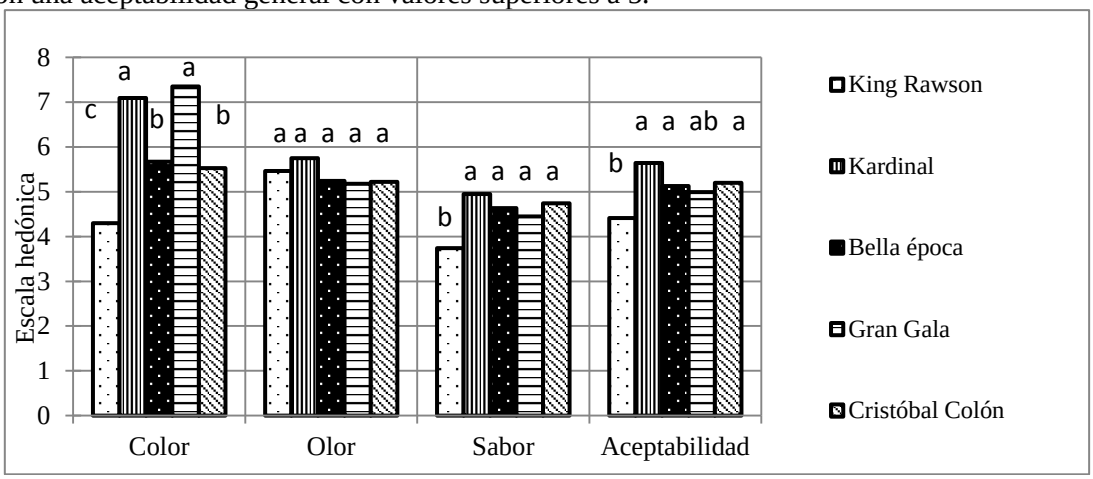


Figura 4. Evaluación de aceptabilidad sensorial de infusiones elaboradas con pétalos de distintas variedades de rosa. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

En cuanto a la aceptabilidad por atributos, como se observa en la **Figura 1**, se hallaron diferencias significativas entre las distintas variedades en las evaluaciones de color y sabor (p<0,05) mientras que para el atributo olor todas las infusiones presentaron valores cercanos a 5 sin diferencias significativas entre sí (p>0,05). Las mayores puntuaciones se observaron para el atributo color, siendo *Kardinal* y *Gran Gala* las de mayor aceptabilidad. En cambio, para el atributo sabor, se presentaron los menores valores de aceptabilidad y *King Rawson* fue el valor más bajo y significativamente diferente al resto. Un aspecto a destacar es que, en el promedio de las pruebas realizadas, ninguna infusión recibió la puntuación equivalente a "me disgusta extremadamente".

Fenoles totales en infusiones

En la **Figura 5** se muestra el contenido de FT de las infusiones de rosa junto a dos tés comerciales: negro y verde. Las infusiones elaboradas con los pétalos de rosa *Kardinal* y *Gran Gala* presentaron los mayores contenidos (p < 0,05) en FT (55,1 y 48,5 mg ácido clorogénico/g bs respectivamente) incluso más elevados que el té verde (34,8 mg ácido clorogénico / g bs). *King Rawson* y *Cristóbal Colón* fueron las variedades con menor contenido de FT (29,1 y 29,2 mg ácido clorogénico/g bs respectivamente) aunque sin diferencias significativas con el té negro (p > 0,05). El alto contenido de fenoles totales en las variedades de pétalos de color rojo está asociado a una mayor concentración de compuestos fenólicos: antocianinas (Mlcek y Otakar 2011). Por otro lado, los pétalos de color amarillo y naranja están vinculados al contenido de compuestos antioxidantes no fenólicos: los carotenoides. Altos contenidos de luteína se han hallado en variedades de flores color naranja (Bhattacharyya *et al*. 2008).

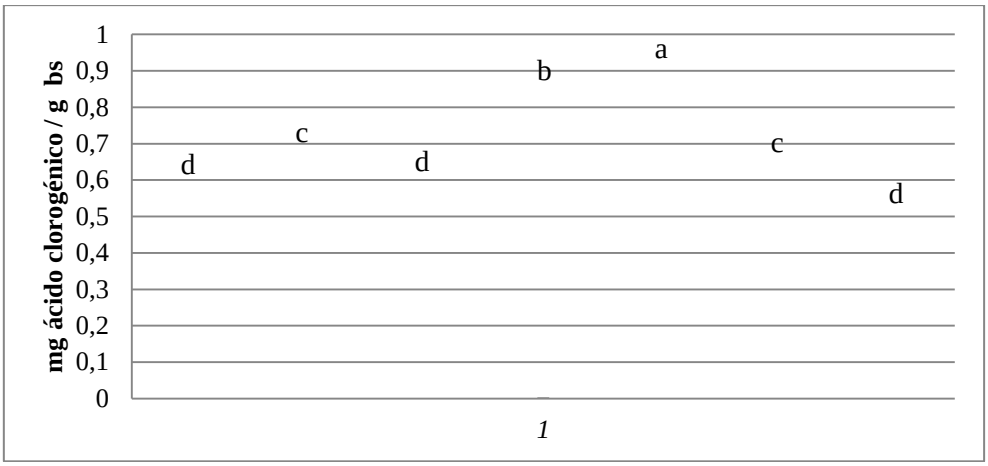


Figura 5. Contenido de fenoles totales en infusiones elaboradas con distintas variedades de rosa. (Resultados expresados en mg ácido clorogénico / g bs).
Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Actividad antioxidante en infusiones

En la **Figura 6** se observa la AA de las infusiones de rosa junto a dos tés comerciales: té negro y té verde. Estos tés pertenecen al grupo de estimulantes que son importantes para la salud debido a su elevada actividad antioxidante (Mlcek *et al*. 2011). Al igual que lo observado en el contenido de FT, las infusiones elaboradas con los pétalos de rosa *Gran Gala* y *Kardinal* presentaron mayor ($p < 0,05$) AA (59,9; 63,1 mg TROLOX/ g bs respectivamente) que el té verde (56,6 mg TROLOX/ g bs) y el té negro (37,8 mg TROLOX/ g bs). *King Rawson* (33,1 mg TROLOX/ g bs) fue la única variedad en la que se observó una AA inferior ($p < 0,05$) a los tés comerciales. Vinokur *et al*. (2006) evaluaron la AA de infusiones elaboradas con distintas variedades de rosa y, al igual que en el presente estudio, las infusiones elaboradas con pétalos color rojo presentaron mayor AA que el té verde y aquellas elaboradas con pétalos de color amarillo fueron las únicas infusiones en las que la AA fue menor al contenido hallado en tés comerciales. Del mismo modo que lo reportado por estos autores, la AA de la mayoría de las infusiones presentó un patrón similar al contenido de FT. Las infusiones elaboradas con flores comestibles presentan una ventaja nutricional con respecto a los tés debido a que no contienen cafeína, representando esta última un factor que promueve un incremento transitorio de la presión sanguínea (Hodgson *et al*. 1999). A su vez, las infusiones elaboradas con pétalos de rosa son consideradas de una elevada AA comparadas con otras plantas medicinales (VanderJagt *et al.* 2002).

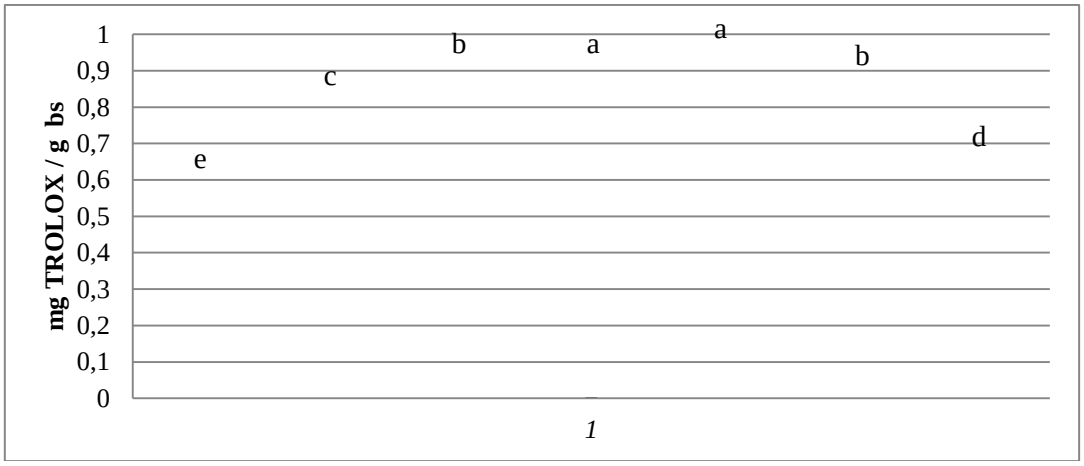


Figura 6. Actividad antioxidante de infusiones elaboradas con distintas variedades de rosas.

(Resultados expresados como mg TROLOX / g bs).
Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Correlación entre el contenido de FT y la AA de las infusiones

En la **Figura 7** puede observarse la correlación entre el contenido de FT y la AA de las infusiones evaluadas menos de la variedad *Cristóbal Colón*. Al comparar la totalidad de las muestras se halló una baja correlación entre los parámetros evaluados (R^2= 0,5876). Por lo tanto, se decidió descartar el punto que más se alejaba de la recta (variedad *Cristóbal Colón*). De esta manera se obtuvo una correlación alta entre la AA y el contenido de FT (R^2= 0,7543) coincidiendo con lo reportado por Vinokur *et al*. (2006). Esto sugiere que la AA de la mayoría de las infusiones podría atribuirse a la presencia de polifenoles.

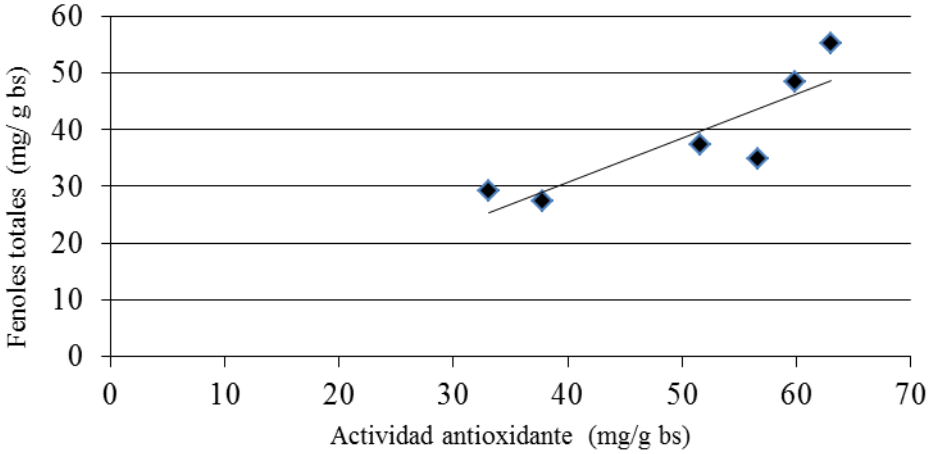


Figura 7. Correlación entre la AA y el contenido de FT de las infusiones.

CONCLUSIONES

Los pétalos de rosa son una buena fuente de compuestos bioactivos que podrían utilizarse para inhibir el crecimiento microbiano y/o la oxidación de lípidos en alimentos. Además, de ser empleados en el desarrollo de alimentos funcionales o farmacéuticos para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por el estrés oxidativo. La elaboración de infusiones de pétalos de rosa representaría una alternativa para su aprovechamiento.

BIBLIOGRAFIA

Association of Official Agricultural Chemist. (1960). Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemist, 9t n edition, 832 pp. Washington (USA).

Barash CW. 1998. The flavours of flowers. Herb companion 10: 32-37.

Benvenuti S, Bortolotti E, Maggini R. 2016. Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. Scientia Horticulturae 199: 170–177

Bernal J, Mendiola JA, Ibañez E, Cifuentes A. 2011. Review: Advanced analysis of nutraceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55: 758–774.

Bhattacharyya S, Roychowdhury A, Ghosh S. 2008. Lutein content, fatty acid composition and enzymatic modification of lutein from marigold (Tagetes patula L.) flower petals. Journal of the Indian Chemical Society, 85, 942-944.

Cai YZ, Xing J, Sun M, Zhan ZQ, Corke H. 2005. Phenolic antioxidants hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from rosa chinensis flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 9940–9948.

China R, Mukherjee S, Sena S, Bose S, Datta S, Koley H, Ghosh S, Dhar P. 2012. Antimicrobial activity of Sesbania grandiflora flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism Lactobacillus acidophilus. Microbiological Research 167:500– 506.

De Ancos B, Colina-Coca C, González-Peña D, Sánchez-Moreno C. 2015. Chapter 1. Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products. En: Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications. Ed. Vijai Kumar Gupta, Maria G. Tuohy, Mohtashim Lohani, Anthonia O'Donovan. Publicado por John Wiley & Sons, Ltd.

Hansen L. 2007 Caracterización de los viveros de la zona de San Pedro (Buenos Aires)(En línea) http://inta.gob.ar/documentos/caracterizacion-de-los-viveros-de-la-zona-de-san-pedro-buenos-aires/ consulta <11/07/13> http://anterior.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2008/lh_0802.htm

Hodgson JM, Puddey I B, Burke V, Beilin L J, Jordan N. 1999. Effects on blood pressure of drinking green and black tea. Journal of Hypertension, 17: 457- 463.

Kaisoon O, Konczak I, Siriamornpun S. 2012. Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. Food Research International 46: 563–571.

Kumar N, Bhandari P, Singh B. 2009. Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: Rosa damascena, Rosa bourboniana and Rosa brunonii. Food and Chemical Toxicology. 47 (2): 361-367.

Lawless HT, Heymann H. 2010. *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices.* 2nd ed. New York. Springer-Verlag New York. P 325-347.

Liu RH. 2013. Dietary bioactive compounds and their health implications. Journal of Food Science, 78 (1): A18–A25.

Mavi A, Terzi Z, Ozgen U, Yildrim A, Coskun M. 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: Prangos ferulacea (Apiaceae), Sedum sempervivoides (Crassulaceae), Malva neglecta (Malvaceae), Cruciata taurica (Rubiaceae), Rosa pimpinellifolia (Rosaceae), Galium verum subsp.verum (Rubiaceae), Urtica dioica (Urticaceae). Biological and Pharmaceutical Bulletin 27: 702–705.

Mlcek J, Otakar R. 2011. Fresh edible flowers of ornamental plants: A new source of nutraceutical foods. Trends in Food Science and Technology 22 p. 561-569.

Rajeshwari CU, Shobha RI, Andallu B. 2014. Review: Phytochemicals in diet and human health with special reference to polyphenols. Annals of Phytomedicine, 3(2): 4-25.

VanderJagta TJ, Ghattasa R, VanderJagta DJ, Crosseyb M, Glew RH. 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. Life Sciences 70. 1035–1040.

Vinokur Y, Rodov V, Reznick N, Goldman G, Horev B, Umiel N, Friedman H. 2006. Rose Petal Tea as an Antioxidant rich Beverage: Cultivar Effect. Journal of Food Science. Vol. 71-1. P. 42-47.

Xiong L, Yang J, Jiang Y, Lu B, Hu Y, Zhou F, Mao S, Shen C. 2014. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of 10 Common Edible Flowers from China. Vol. 79, Nr. 4. Journal of Food Science

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de estas actividades al Proyecto Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor (PNAIyAV) 1130043 y al Proyecto Regional con Enfoque Territorial San Pedro- Baradero (PRET) 1271208.

Estimación del período de vida útil de una fórmula para nutrición enteral experimental en función de la disminución de la lisina disponible.

Galán M.G.[1, 2], Artero N.[3], Barducco M.F.[3] y Drago S.R.[1, 2]

(1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
(2) Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), Área Cereales y Oleaginosas, Facultad de Ingeniería Química (FIQ), Universidad Nacional del Litoral (UNL), 1º de Mayo 2829, Santa Fe, Argentina.
(3) Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina.
sdrago@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estimar el período de vida útil (VU) de una fórmula enteral experimental (FEE) en polvo, almacenada a cuatro temperaturas diferentes (5, 15, 30 y 45ºC) durante 3 meses, a través de la evaluación de la lisina disponible (LD) y del desarrollo de color. Al final del estudio (90 días), se produjo una disminución de la LD del 17,11 y 44,79% en las FEE almacenadas a 30 y 45ºC, respectivamente. Estas últimas presentaron valores de LD por debajo de los valores de lisina recomendados por el Código Alimentario Argentino para alimentos de régimen (58 mg Lys/g proteína). Se observó desarrollo de color en las muestras almacenadas a mayor temperatura y por mayor período de tiempo, que fue relacionado con la reacción de Maillard. La reacción de deterioro siguió una cinética de primer orden y la VU calculada a partir de la LD fue de 25 meses a temperatura de refrigeración (5ºC) y de 7 meses a temperatura ambiente (20ºC).

Palabras clave: fórmula enteral, vida útil, lisina disponible, reacción de Maillard.

ABSTRACT

The aim of this study was to estimate the shelf life (SL) of a powder experimental enteral formula (EEF), stored at four different temperatures (5, 15, 30 and 45ºC), for three months, through the evaluation of available lysine (AL) and color development. At the end of the study (90 days), there were 17.11 and 44.79% reduction of AL in EEF stored at 30 and 45°C, respectively. These last formulas presented AL values below lysine values recommended by the Argentine Food Code for regimen foods (58 mg Lys/g protein). Color development was related to Maillard's reaction occurring in the samples stored at higher temperature for longer period. The deterioration reaction followed a first order kinetics and the SL calculated from the AL was 25 months at refrigeration temperature (5°C) and 7 months at room temperature (20ºC).

Keywords: enteral formula, shelf life, available lysine, Maillard reaction.

INTRODUCCIÓN

Las formulas enterales (FE) son sistemas complejos que deben contener todos los macro y micronutrientes necesarios para el mantenimiento y recuperación de los pacientes. En la formulación de dichos alimentos se debe tener en cuenta que están destinados, en muchos casos, a pacientes críticos que presentan riesgo nutricional, ya sea por traumas, situaciones perioperatorias o por la misma patología de base, por lo cual se vuelven fundamentales los aspectos cuali y cuantitativos de los nutrientes que se incorporan (Kenneth y Kudsk 2007). Los alimentos deshidratados, por sus características físicas y químicas tienen una vida útil relativamente larga. En ocasiones, es necesario resolver problemas de estabilidad de estos alimentos ya que ésta define su valor comercial. La manera de resolver estos problemas consiste en investigar los mecanismos y principios cinéticos generales de la degradación de los componentes menos estables de dichos alimentos. Por otro lado, es fundamental conocer el tiempo de aptitud o vida útil (VU) de las FE en polvo para

mantenerlas en el mercado sin ningún problema de seguridad ni deterioro de sus propiedades nutricionales. La VU es un período en el cual, bajo circunstancias definidas, se produce una tolerable disminución de la calidad del producto. La calidad engloba muchos aspectos del alimento, como sus características físicas, químicas, microbiológicas, sensoriales, nutricionales y referentes a inocuidad. Cuando alguno de estos parámetros se considera inaceptable, el producto ha llegado al fin de su VU (Singh 1999). Este período depende de muchas variables, entre la que se incluyen tanto al producto como a las condiciones ambientales y al envase. Dentro de las que ejercen mayor peso, se encuentran la temperatura, el pH, la actividad del agua, la humedad relativa, la radiación (luz), la concentración de gases, el potencial redox, la presión y la presencia de iones (Brody 2003). La VU se determina sometiendo el producto a estrés, en condiciones de almacenamiento controladas (Charm 2007). En primer lugar, es necesario identificar y/o seleccionar la variable cuyo cambio primero identifica el consumidor como una baja en la calidad del producto (Brody 2003). Por ejemplo, en algunos casos esta variable puede ser la rancidez, cambios en el color, sabor o textura. También son fundamentales los aspectos nutricionales no detectables a simple vista como pérdida de vitamina C, la disminución de la digestibilidad proteica, o inclusive la aparición de poblaciones inaceptables de microorganismos.

A pesar de la importancia de mantener el contenido nutricional de las FE, existen datos limitados sobre las modificaciones de los nutrientes durante el almacenamiento. Lowry et al. (1989) observaron una disminución en la calidad de las proteínas y la biodisponibilidad remanente por efecto de la temperatura, en FE comerciales líquidas. Frías y Vidal-Valverde (2001) encontraron una disminución del contenido de vitaminas (tiamina, A y E) durante el almacenamiento de las FE líquidas. Uddin et al. (2002) describieron que la degradación del ácido ascórbico depende de condiciones de almacenamiento como temperatura y actividad acuosa, resultando en mayores pérdidas a medida que aumentan estos parámetros. Los lípidos también pueden sufrir reacciones de oxidación, lo que conduce a la pérdida de nutrientes y al desarrollo de productos secundarios (Cesa 2004). Por otro lado, García Baños et al. (2005) encontraron que una de las principales modificaciones inducidas por condiciones de calentamiento y almacenamiento es la reacción de Maillard y hallaron que el progreso de dicha reacción fue diferente según la temperatura de almacenamiento de la FE en polvo. Todos estos cambios producidos durante el almacenamiento pueden alterar el valor nutricional de las FE.

Una de las principales modificaciones inducidas por el calentamiento y las condiciones de almacenamiento, es la reacción de Maillard, que puede producir una pérdida de valor nutritivo (Henle et al. 1999, Lowry y Bake 1989). Desde el punto de vista organoléptico, el pardeamiento es deseable en algunos tipos de alimentos (productos de panadería y café), mientras que es indeseable en productos esterilizados o secos como leche en polvo, suero de leche, o fórmulas enterales (Mottram 2007). La reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático, se produce entre un grupo aldehído o cetona proveniente de azúcares reductores como la glucosa, la fructosa, la lactosa o la maltosa y un grupo amino libre de un aminoácido o una proteína. Esto da lugar a la generación de los denominados productos de reacción de Maillard que, especialmente en etapas avanzadas, son compuestos de tono oscuro que se asocian con el proceso de pardeamiento (Delgado-Andrade et al. 2011). La reacción está favorecida en alimentos con un elevado contenido de proteínas y carbohidratos reductores. Además, está intensamente influenciada por la temperatura, el tiempo de reacción, la actividad del agua (0,3-0,7) y valores de pH en el intervalo de 4-7. Esta reacción ocurre lentamente a bajas temperaturas y con mayor facilidad en alimentos deshidratados (Cardelle-Cobas y Villamiel 2005).

La reacción de Maillard disminuye el valor nutritivo de los alimentos al disminuir la disponibilidad biológica de aminoácidos esenciales (O'Brien y Morrisey 1997). La lisina es el aminoácido más afectado por esta reacción. No obstante, el tratamiento térmico de los alimentos produce pérdida de otros aminoácidos indispensables como los aminoácidos azufrados (Adrian 1982, Bjorck et al. 1983), triptofano (Bjorck et al. 1984) e histidina (Lee et al. 1982). La lisina se pierde rápidamente en la primera fase de la reacción de Maillard a causa de su grupo ε-amino libre. De allí que la determinación de la lisina disponible (LD) puede usarse como un indicador de la extensión del pardeamiento no enzimático, que es una reacción que se produce habitualmente durante el almacenamiento de productos deshidratados.

El color es una característica importante de los productos a comercializar y, junto con la textura y el aroma,

contribuye a su aceptación por parte del consumidor. La formación de color durante el procesado y conservación de los alimentos puede ser debida, entre otras causas, a la reacción de Maillard y a la caramelización (Rufián Henares et al. 2006). En las etapas iníciales de la reacción de Maillard, no hay producción de color; en la intermedia, se forman colores amarillos muy suaves. Muchos de los olores y sabores son generados durante el proceso de elaboración, en etapas intermedias de la reacción, o en la etapa final donde se forman los pigmentos oscuros o pardos denominados melanoidinas. Los compuestos de Amadori son incoloros, pero se consideran precursores del color, ya que su evolución da lugar a la formación de melanoidinas, características del color pardo o negruzco asociado al final de la reacción (Cardelle- Cobas y Villamiel 2005).

Por lo antes dicho, el objetivo del presente trabajo fue estimar el período de vida útil de una fórmula para nutrición enteral experimental (FEE) en polvo, en función de la disminución de la lisina disponible y evaluar el desarrollo de color relacionado con la reacción de Maillard.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentos y procedimientos

Muestra

Se evaluó una FEE en polvo normocalórica (1 Kcal/mL) y normoproteica (18% de las Kcal aportadas por las proteínas), de sabor neutro. Se utilizaron los siguientes ingredientes para el desarrollo de la FEE: maltodextrina de maíz (El Bahiense S.A., Argentina), aceite de girasol de alto oleico y cártamo (Cocinero, Molinos Río de La Plata S.A., Argentina), lecitina de soja (El Bahiense S.A., Argentina), caseína (SANCOR C.U.L., Argentina), sulfato ferroso (FeSO4 7H2O, Cicarelli, Argentina), sulfato de zinc (ZnSO4.7H2O, Cicarelli, Argentina), citrato de calcio (Tate & Lyle S.A., Argentina), mix vitamínico (A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina, colina, e inositol, provisto por Nutralia S.R.L., Argentina), ácido ascórbico (Cicarelli, Argentina), en relación molar Fe:AA 1:4 para promover la bioaccesibilidad de Fe (Drago y Valencia, 2004).

Los ingredientes fueron pesados en balanza de precisión (Adventure Ohaus, EEUU., +/- 0,0001g) y las muestras fueron manualmente colocadas en bolsas multilaminadas y térmicamente selladas. Dichas bolsas están formadas de multicapas de papel (glassine de 60g/m2), plástico (polietileno de baja densidad 50g/m2) y papel de aluminio (de 0,09mm de espesor).

Al momento de realizar los análisis las muestras fueron dispersadas en agua destilada, para alcanzar un contenido de sólidos totales del 37%, homogenizando durante 2 min con una procesadora manual (500 Watts, Liliana, Argentina).

Estudio de estabilidad

Las muestras fueron evaluadas a cuatro temperaturas de almacenamiento: 5, 15, 30 y 45ºC, usando cámaras termostatizadas (Tecno Dalvo S.R.L., Argentina), durante 3 meses, en lapsos adecuados de tiempo (0, 15, 30, 60 y 90 días). Para estimar la cinética de deterioro (velocidad, orden de reacción y energía de activación: Ea) durante el almacenamiento de las muestras y la VU de la FEE, se evaluó el contenido de LD, utilizando el procedimiento propuesto por Singh (1999).

Métodos analíticos

Color

Las muestras en polvo se colocaron en cubetas blancas de 1 cm de espesor, y se midieron utilizando un espectrofotómetro Minolta 508d (Minolta Co., LTD., Japón), en las siguientes condiciones: iluminante D65, ángulo del observador 10º, SCE (componente especular excluido), evaluándose los parámetros correspondientes al sistema CIE: L*, a*, b*. El parámetro L* mide el grado de luminosidad (L*= 100: blanco; L*= 0: negro), el a*, el grado de componente rojo o verde (a* > 0: rojo; a* < 0: verde) y el b* el grado de componente amarillo o azul (b* > 0: amarillo b* < 0: azul). Además, se calculó el índice de amarillamiento (Yellow Index: YI) como una medición del color relacionado a la intensidad del pardeamiento (Rufián-Henares et al. 2006), utilizando la siguiente ecuación: YI = 142,86 b*/L*.

Lisina Disponible

Para el análisis de la LD se utilizó el método de Carpenter (1960) modificado por Booth (1971), que involucra la reacción de Sanger.

Estimación de la Vida Útil

Una simple aproximación para determinar el efecto de la temperatura en la calidad de los alimentos fue descripta por Singh (1999), que se describe a continuación.

Para un determinado orden de reacción se tiene que:

$$k = \frac{\text{pérdida de calidad al tiempo } t_s}{t_s} \qquad (1)$$

Donde, t_s es el tiempo final de vida útil y el numerador es la pérdida de calidad al tiempo t_s. Para una reacción de primer orden es $ln\ Q_0/Q_e$ y para una reacción de orden cero es $Q_0 - Q_e$. El término Q_e es el valor alcanzado del atributo de calidad al tiempo t_s y tomando logaritmo a ambos lados de la ecuación (1) se obtiene:

$$\ln k = \ln (\text{calidad pérdida en el tiempo } t_s) - \ln t_s$$

La ecuación de Arrhenius (k= k0 exp (-Ea / RT) puede ser reformulada de la siguiente manera:

$$-\ln t_s = -\ln (\text{calidad perdida al tiempo } t_s) + \ln k_0 - E_a/RT \qquad (2)$$

De acuerdo a la ecuación (2), un gráfico semilogarítmico de t_s en función de 1/T debe dar una línea recta y la energía de activación se obtiene de la pendiente: $+E_a/2{,}303\ R$. Donde 2,303 es la conversión a logaritmo decimal.

Para pequeños rangos de temperatura, menores a ± 20ºC, t_s puede ser calculado directamente en función de T sin cometer errores significativos. Por lo tanto, la ecuación de la línea recta en el grafico semilogarítmico puede ser escrita de la siguiente manera:

$$t_s = t_0 e^{-a\Delta T}$$

Donde, t_0 es la vida útil a la temperatura de referencia (T_0), ΔT es la diferencia de temperatura entre la temperatura a la cual se desea estimar la vida útil, t_s, y la temperatura de referencia, y a es la pendiente de la recta ya mencionada.

Análisis estadísticos

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Para el estudio estadístico se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido por el test LSD (*least significant difference*) para comparar medias al 95% de confianza, utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución del color de la FEE

La **Tabla 1** muestra los valores de los parámetros del sistema CIE, en las distintas temperaturas y tiempos de almacenamiento de la FEE.

Tabla 1. Parámetros del sistema CIE de una Fórmula Enteral Experimental, almacenada a 5, 15, 30 y 45ºC, durante 90 días.

Temperatura (ºC)	Almacenamiento (días)	L*	a*	b*
-	**0**	83,9	0,06	9,47
5	**15**	83,55	0,07	9,25
15		83,55	0,07	9,55
30		83,81	0,11	9,53
45		83,11	0,12	10,56
5	**30**	83,5	0,05	9,44
15		83,14	0,07	9,51
30		82,6	0,12	10,8
45		83,15	0,16	12,3
5	**60**	82,91	0,06	10,04
15		83,22	0,16	10,59
30		78,82	0,2	11,31

45		78,51	0,2	12,17
5	**90**	83,86	0,09	10,4
15		82,65	0,19	10,63
30		77,62	0,22	12,55
45		76,01	0,29	13,88

Como se mencionó, una de las principales modificaciones inducidas por las condiciones de almacenamiento a largo plazo es la reacción de Maillard. El desarrollo de color es un indicador evidente y extremadamente importante de la extensión de la reacción de Maillard avanzada (Martins et al. 2000). Los colores producidos van en la gama de amarillo pálido al marrón muy oscuro, dependiendo del tipo de alimento y el alcance de la reacción (Serpen y Gökmen 2009).

Se puede observar que el parámetro L*, que mide el grado de luminosidad, no se modificó durante el almacenamiento a 5 y 15ºC, no ocurriendo lo mismo a 30 y 4 ºC, donde se produjo una disminución a partir de los 60 días de almacenamiento. En cuanto a los parámetros a* y b*, muestran una tendencia a aumentar con el tiempo de almacenamiento, siendo el aumento más marcado a las mayores temperaturas (30 y 45ºC).

En la **Figura 1** se muestra la evolución del YI durante el almacenamiento de la FEE a las diferentes temperaturas, lo cual permite tener una idea del desarrollo de color relacionado con la intensidad del pardeamiento (Rufián Henares et al. 2006).

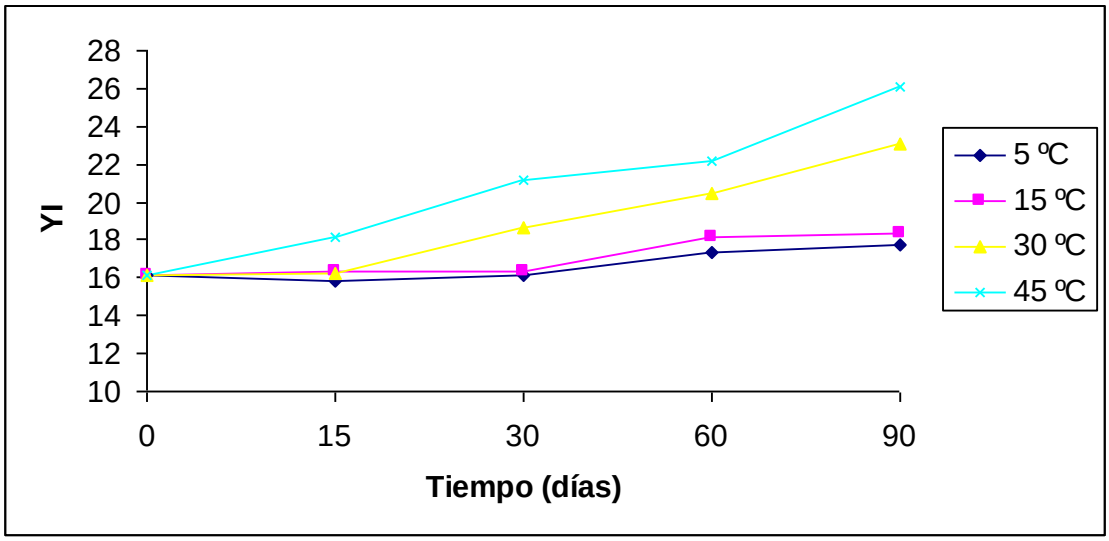


Figura 1. Evolución del índice de amarillamiento (YI) de una Fórmula Enteral Experimental almacenada a 5, 15, 30 y 45ºC, durante 90 días.

Se puede observar que a mayor tiempo y temperatura de almacenamiento se produjo más desarrollo de color, relacionado con la reacción de Maillard.

La misma tendencia de evolución de los parámetros L*, a*, b* y del YI fue observada por Rufián Henares et al. (2006), quienes evaluaron el color de una FE líquida durante el almacenamiento (36 semanas) a 4, 20, 32 y 55ºC. Lowry y Baker (1989) también observaron una disminución del parámetro L tras 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente de una FE comercial. A su vez, las mismas tendencias de evolución de los parámetros L, a* y b*, fueron hallados por Bosch et al. (2007) al evaluar el efecto del almacenamiento, durante 9 meses, de alimentos infantiles a base de cereales y leche, a 25, 30 y 37ºC. Por otro lado, el YI se relacionó de manera inversamente proporcional con el contenido de LD (R^2=0,8056).

La LD se encuentra muy ligada con YI, ya que la lisina se pierde rápidamente en la primera fase de la reacción de Maillard a causa de su grupo ε-NH_2. En trabajos realizados con modelos de caseína-glucosa se demostró que estos grupos amino libres reaccionaron con grupos aldehídos reductores aún en condiciones de poca cantidad de agua para formar compuestos sin valor nutricional (Torres et al. 2001). Bjorck et al. (1984)

estudiaron la formación de color en harinas de trigo sometidas a extrusión y encontraron una correlación entre los valores de reflectancia y el contenido en lisina. McAuley et al. (1987) observaron que los valores Hunter Lab estaban relacionados con la LD en harinas de trigo y diferentes tipos de cereales de desayuno comerciales (copos tostados, tostados y extrudidos e inflados y extrudidos).

Evolución del contenido de LD de la FEE

La lisina es un aminoácido esencial que es considerado como un indicador del valor biológico de la proteína. El contenido de lisina total, sin embargo, no siempre se correlaciona bien con el valor nutricional a causa de que los grupos α y ε-NH_2 libres pueden haber reaccionado con compuestos naturales, tales como los azúcares reductores o aldehídos a partir de la oxidación de lípidos durante el procesamiento o almacenamiento. Por esta razón, es importante determinar el contenido de LD o biológicamente activa (Araújo y Menezes 2005).

En la **Tabla 2** se muestran los contenidos de LD a los diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento estudiados.

Se encontró que sólo las muestras almacenadas a 45ºC por 90 días presentaron valores de LD por debajo de los valores de lisina recomendados por el Código Alimentario Argentino para alimentos de régimen (CAA, Cap. XVII, Art, 1340) (58 mg/g proteína). Al final del estudio se produjo una disminución del 17,11 y 44,79% en la LD de las FEE almacenadas a 30 y 45ºC, respectivamente.

Tabla 2. Contenido de lisina disponible (LD) de una Fórmula Enteral Experimental almacenada a diferentes temperaturas durante 90 días.

Temperatura (ºC)	Almacenamiento (días)	LD (mg/g proteína)
-	**0**	80,18 ± 0,24[c]
5	**30**	80,18 ± 0,94[c]
15		80,35 ± 1,18[c]
30		80,60 ± 0,82[c]
45		69,12 ± 1,76[b]
5	**60**	80,52 ± 0,94[c]
15		80,76 ± 1,06[c]
30		80,52 ± 0,24[c]
45		66,46 ± 3,88[b]
5	**90**	79,77 ± 1,29[c]
15		78,69 ± 0,47[c]
30		66,46 ± 4,12[b]
45		44,27 ± 0,47[a]

Media ± DE. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de la Energía de activación (Ea) de la reacción de deterioro de la LD en la FEE

Cuando se evaluaron los parámetros cinéticos de la reacción de deterioro, se halló que la reacción siguió una cinética de primer orden. En la **Figura 2** se muestran los valores de k correspondientes a las diferentes temperaturas y en la **Figura 3** se muestra la influencia de la temperatura sobre dicha constante de reacción.

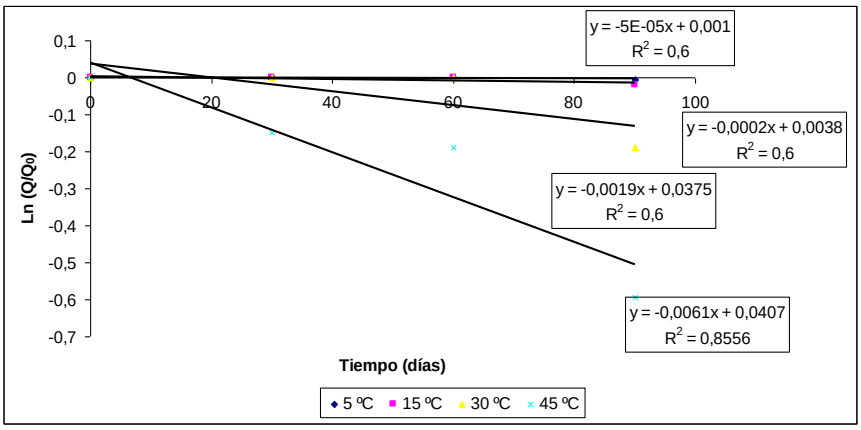


Figura 2. Determinación de los valores de k para la reacción de pérdida de la lisina disponible durante el almacenamiento.

El valor hallado de Ea fue de 90,66 kJ/mol. Torres et al. (2001) hallaron valores inferiores (63,44 kJ/mol), pero también encontraron que la reacción siguió una cinética de primer orden. Por otro lado, como la disminución de la LD se halla relacionada con la reacción de Maillard, se citan dos trabajos que evaluaron la Ea de dicha reacción. Saguy y Karel (1980) plantearon que la Ea para la reacción de Maillard se halla comprendida entre 106,4 y 209,2 kJ/mol, mientras que Burdurlu et al. (2006) hallaron valores de 181,71 kJ/moL.

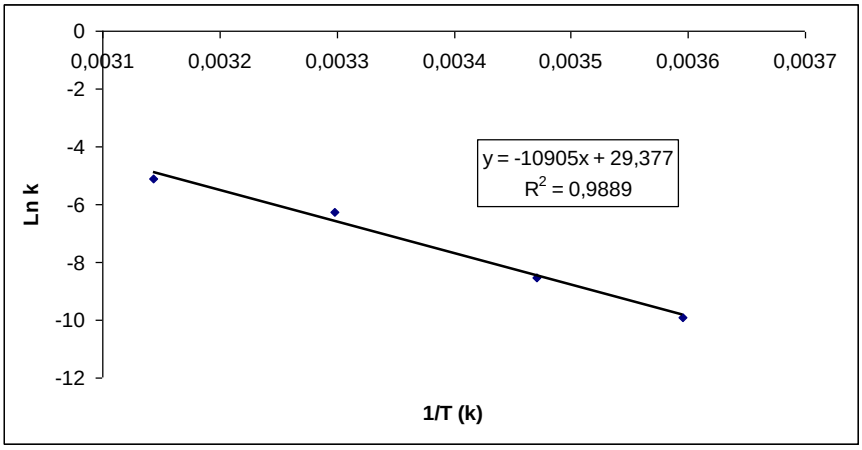


Figura 3. Influencia de la temperatura sobre la constante de reacción de deterioro de lisina disponible durante el ensayo de almacenamiento.

Estimación de la vida útil de la FEE en función de la disminución de la LD

El primer paso para calcular la VU con el método de Singh (1999) es obtener el valor de la pendiente k de la gráfica de decrecimiento porcentual del estimador de calidad, durante el período de almacenamiento a las temperaturas evaluadas, según el orden de reacción. Para ello, en primer lugar se debe determinar el valor que será considerado como una disminución aceptable del nivel de calidad (80% de calidad remanente). En este caso, se seleccionó un valor de LD de 58 mg Lys/g de proteína, ya que este es el valor recomendado por el CAA para alimentos de régimen (CAA, Cap. XVII, Art, 1340). Por otro lado, se consideró como 100% de calidad remanente al valor de LD obtenido al inicio del estudio (80,18 mg/g de proteína). Con estos datos (80 y 100% de calidad remanente) se calcularon los valores del porcentaje de calidad remanente en todos los tiempos y temperaturas de almacenamiento evaluadas y se determinaron los valores de las rectas ya que se

trató de una reacción de orden cero. En la **Figura 4** se muestra el decrecimiento porcentual del estimador de calidad en función del tiempo, para cada temperatura de almacenamiento evaluada.

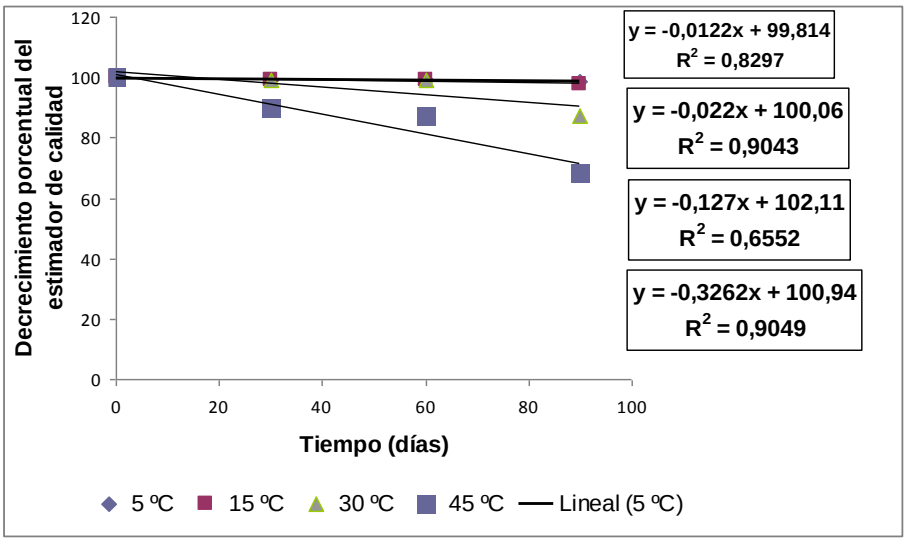


Figura 4. Pérdida de calidad por disminución del contenido de lisina disponible de una Fórmula Enteral Experimental almacenada a 5, 15, 30 y 45ºC, durante 90 días.

A continuación, se calcularon los valores de ts teniendo en cuenta una pérdida de calidad del 20% y se graficó el ln (ts) en función de la temperatura de almacenamiento. La pendiente constituye el valor de a, como se explicó en materiales y métodos. Para calcular el tiempo de vida útil (ts) a temperaturas diferentes de las evaluadas, se consideró como temperatura de referencia (T_0) 30ºC y como tiempo de referencia 90 días, que fue el tiempo máximo evaluado a la temperatura más alta en cuyas condiciones se obtuvo un valor aceptable de calidad remanente. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los tiempos de VU calculados a diferentes temperaturas se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Tiempo de vida útil (ts) de una Fórmula Enteral Experimental a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Temperatura (ºC)	Ts (días)
5	757
10	495
15	323
20	211
25	138
30	90
35	59
40	38
45	25
50	16

Se puede observar que a 5ºC la FEE tendría una VU de 25 meses, lo que resulta similar a la VU declarada en los rótulos de las FE comerciales (24 meses). Sin embargo, las FE son raramente conservadas en refrigeración, tanto en las cocinas hospitalarias como en el ámbito domiciliario, sino que se conservan a temperatura ambiente (20ºC), y en ese caso la VU de la FEE sería de 7 meses. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la temperatura ambiente en una cocina hospitalaria puede alcanzar cifras elevadas y más aún en

verano, donde puede llegar a 30 – 40ºC, con la consiguiente disminución de la calidad nutricional de este tipo de fórmulas. Por otro lado, sería de interés realizar un estudio de estabilidad de la FEE a 30ºC, durante 24 meses, para poder proyectar los resultados.
Los resultados del presente estudio coinciden con los hallados por Torres et al. (2001), quienes evaluaron la VU de una fórmula para niños con síndrome diarreico, empleando la disminución de LD como indicador de deterioro. Dichos autores encontraron que la VU de dicha fórmula sería de 6,22 meses a 20ºC.

CONCLUSIONES

Los dos parámetros evaluados en la FEE (color y LD) fueron afectados por el tiempo y temperatura de almacenamiento. El desarrollo de color se halla relacionado con la reacción de Maillard y la disminución de LD podría explicarse por la interacción de los productos de oxidación de lípidos y los carbohidratos reductores con las proteínas.
A temperatura de heladera (5ºC) la VU de la FEE sería de 25 meses, pero a temperatura ambiente (20ºC), se reduce a 7 meses. Debido a esto, podría constituir una recomendación importante el conservar refrigerados estos tipos de alimentos, para prolongar su VU y evitar el deterioro de sus propiedades nutricionales, que son fundamentales en pacientes críticos que reciben alimentación enteral.

BIBLIOGRAFIA

Adrian J. 1982. The Maillard reaction. En Rechcigl M. Handbook of nutritive value of processed food. Food for human use. (Florida). CRC press.
Araújo EM, Menezes HC. 2005. Composição centesimal, lisina disponível edigestibilidade in vitro de proteínas de fórmulas para nutrição oral ou enteral. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25(4): 768-771.
Bjorck I, Asp NG, Dahlqvist A. 1984. Protein nutritional value of extrusion-cookedwheat flours. Food Chemistry, 15(3): 203-214.
Bjorck I, Noguchi A, Asp NG, Cheftel JC, Dahlqvist A. 1983. Protein nutritional value of a biscuit processed by extrusion cooking: effects on available lysine. Journal of Aagricultural and Food Chemistry, 31:488-492.
Booth VH. 1971. Problems in the determination of FDNB-available lysine. Journal of the Science of. Food and Agriciculture, 22: 658-666.
Bosch L, Alegria A, Farre R, Clemente G. 2007. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk–cereal based infant foods during storage. Food Chemistry, 105(3): 1135-1143.
Brody AL. 2003. Predicting Packaged Food Shelf Life. Food Technology, 57(4): 100-102.
Burdurlu HS, Koca N, Karadeniz F. 2006. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. Journal of Food Engineering, 74(2): 211-216.
Cardelle- Cobas A, Villamiel M. 2005. Evaluación del pardeamiento no enzimático en alimentos derivados de cereales. Alimentación Nutrición y Salud. 12(3): 91-100.
Cardelle- Cobas A, Villamiel M. 2005. Evaluación del pardeamiento no enzimático en alimentos derivados de cereales. Alimentación Nutrición y Salud, 12(3): 91-100.
Carpenter KJ. 1960. The estimation of available lysine in animal protein foods. Biochemical Journal. 77: 604-610.
Cesa S. 2004. Malondialdehyde contents in infant milk formulas. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(7): 2119-2122.
Charm SE. 2007. Food engineering applied to accommodate food regulations, quality and testing. Alimentos Ciencia e Ingeniería, 16(1): 5-8.
Código Alimentario Argentino (CAA). Capítulo XVII: Alimentos de régimen o dietéticos. Artículo 1340 - (Res 1505, 10.08.88). On Line: http://www.msal.gov.ar/argentinasaludable/pdf/CAPITULO_XVII.pdf.
Delgado-Andrade C, Seiquer I, García MM, Galdó G, Navarro MP. 2011. Increased intake of Maillard reaction products reduces phosphorous digestibility in male adolescents. Nutrition, 27(1): 86-91.
Drago SR y Valencia ME. 2004. Influence of components of infant formulas on in vitro iron, zinc, and

calcium availability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(10): 3202-3207.
Frıas J, Vidal-Valverde C. 2001. Stability of thiamine and vitamins E and A during storage of enteral feeding formula. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 2313–2317.
García-Baños JL, Del Castillo MD, Sanz ML, Olano A, Corzo N. 2005. Maillard reaction during storage of powder enteral formulas. Food Chemistry, 89(4): 555–560.
Henle T, Walter H, Klostermeyer H. 1991. Evaluation of the extent of the early Maillard reaction in milk products by direct measurement of the Amadori product lactulose lysine. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 193(2): 119-122.
Kenneth A, Kudsk MD. 2007. Beneficial effect of enteral feeding. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America, 17(4): 647–662.
Lee TC, Pintauro CM, Chichester CO. 1982. Nutritional and toxicological effects of non enzymatic Maillard browning.Diabetes, 31:37-46.
Lowry KR, Baker DH. 1989. Effect of storage, carbohydrate composition and heat processing on protein quality and amino acid bioavailability of a commercial enteral product. Journal of Food Science, 54(4): 1024–1030.
Martins SI, Jongen WM, Van Boekel MA. 2000. A review of Maillard reaction in foodand implications to kinetic modelling. Trends in Food Science & Technology, 11(9): 364-373.
McAuley JA,Kunkel ME, Acton JC. 1987. Relationships of available lysine to lignin, color and protein digestibility of selected wheat-based breakfast cereals. Journal of Food Science, 52(6): 1580-1582.
Mottram DS. 2007. The Maillard reaction: source of flavour in thermally processed foods. En Berge RG. Flavours and fragrances. Berlin: Springer. pag 269-283.
O'Brien J, Morrissey PA. 1997. Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. Food Chemistry, 58(1): 17-27.
Rufian Henares JA, Guerra-Hernandez E, Garcia-Villanova B. 2006. Colour measurement as indicator for controlling the manufacture and storage of enteral formulas. Food Control, 17(6): 489-493.
Saguy I, Karel M. 1980. Modeling of quality deterioration during food processing and storage. Food Technology, 34(2): 78-84.
Serpen A, Gökmen V, 2009. Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color. J. Food Comp. Anal. 22(6): 589-595.
Singh RP. 1999. Scientific principles of shelf life evaluation. En: Singh RP. Shelf life evaluation of foods. 1º ed. Maryland. Aspen Publisher Inc. Pag 3-25.
Torres A, Guerra M, Rosquete Y. 2001. Estimación de la Vida Útil de una Fórmula Dietética en función de la disminución de Lisina Disponible. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21(2): 129-133.
Uddin MS, Hawlader MNA, Ding L, Mujumbar AS. 2002. Degradation of ascorbic acid in dried guava during storage. Journal of Food Engineering, 51: 21-26.

Evaluación sensorial de yerba mate elaborada con métodos alternativos

Holowaty S.A.[1,2], Alegre A.C.[1], Schmalko M.E. [1]

(1) Universidad Nacional de Misiones, F. de Azara 1552, Posadas, Argentina.
(2) IMAM (CONICET) – UNaM, F. de Azara 1552, Posadas, Argentina.
alegrecarolinaa@gmail.com

RESUMEN

El secado tradicional de yerba mate se realiza por contacto directo con gases de combustión de madera a elevada temperatura. Los métodos alternativos de secado de yerba mate surgieron de los cuestionamientos por la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos. El objetivo fue evaluar las diferencias sensoriales en muestras procesadas con métodos alternativos respecto al secado tradicional (MT). Para obtener muestras por métodos alternativos, se partió de ramas verdes de yerba mate del mismo lote que el destinado a MT y se zapecaron con agua caliente (MA) o vapor (MV), luego se secaron en lecho fijo. También se comparó MT con el secado utilizando microondas (MO). Se estacionaron las muestras durante 40 días en una cámara acondicionada, luego se molieron. Se evaluaron los extractos obtenidos con un equipo que simula el consumo del mate. Se utilizó el test sensorial del triángulo y participaron 40 personas. Se compararon las parejas de extractos del MT respecto a MA, MV y MO. Se encontraron diferencias entre MA y MT, no así en las muestras MV y MO respecto a MT. De acuerdo a lo manifestado por los catadores, las muestras en procesadas con los nuevos métodos fueron aceptables en todos los casos.

Palabras Clave: Yerba mate, procesos alternativos, calidad sensorial.

ABSTRACT

Yerba mate is traditional drying using direct contact of wood burning gases at high temperature. The direct contact with hot combustion gases is not accepted now in many food products due to the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons. In order to avoid the direct contact with the burning gases, some novel processing methods was assayed. The aim of this research was to compare the sensory attributes of these methods with the traditional processing (MT). For the alternative processes, the same samples were treated in parallel with the traditional process (MT). Green branches were treated using hot water (MA) and saturated steam (MV), and then, they were dried in a fixed bed drier. In addition, yerba mate samples were dried in a microwave drier (MO). All samples were aged in a conditioned chamber during 40 days, and then they were ground. Extracts were evaluated using equipment that simulates mate consumption. The triangle sensorial test was used to compare the samples with 40 panelists. Paired samples of MT with MA, MV and MO were compared. Statistical differences were found between MT and MA, but not with MV and MO. According to the panelists, samples processed with the novel methods were accepted in all cases.

Keywords: Yerba mate, alternative process, sensory quality.

INTRODUCCIÓN

El procesamiento de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) comprende 5 etapas: zapecado, secado, molienda gruesa o canchado, estacionamiento y molienda fina. Las tres primeras se llevan a cabo en establecimientos denominados de “procesamiento primario” o “secaderos”.

El zapecador tradicional es un tambor rotatorio en el que las ramas se ponen en contacto con gases de combustión de leña en corriente paralela. El tiempo de residencia varía entre 2 y 4 minutos y en el mismo las hojas alcanzan temperaturas superiores a los 100ºC, lo que produce la inactivación de las enzimas presentes en ellas, que podrían producir su pardeamiento en la etapa de secado (Schmalko y Alzamora, 2001).

También se produce en el zapecador una pérdida muy importante de humedad. El contenido de humedad de las hojas se reduce desde un 55% (base húmeda) hasta un 20% (bh) aproximadamente; mientras que en los palos varía desde el 55% (bh) hasta el 50% (bh) (Schmalko y Alzamora, 2005). Las ramas son luego introducidas al secadero, que generalmente es de tipo cinta y pueden tener 1 o 2 etapas. A su vez, las cintas se pueden ubicar en formas superpuestas una arriba de la otra. La temperatura del aire o gases de combustión que ingresa al secadero varía entre 90 y 120ºC, siendo la más usual de 100º. Luego del canchado o molienda gruesa, la Yerba Mate se coloca en bolsas de 40-50 Kg y éstas se almacenan en depósitos para su estacionamiento. El mismo se lleva a cabo utilizándose 3 métodos diferentes y de acuerdo a ello el tiempo varía entre 60 días a 18 meses. Durante el estacionamiento se producen reacciones que involucran la pérdida del color verde intenso y la modificación del sabor amargo de la yerba mate, generando un olor característico de la yerba cuando se halla lista para el consumo (Gómez Vara et al., 1979, Holowaty et al., 2014a).

El desarrollo de procesos alternativos para la elaboración de la yerba mate se inicia a fines de la década de 1990 con el estudio de zapecado con agua caliente. En este periodo Xander et al. (2000), estudiaron la actividad de enzimas del grupo polifenoloxidasas que producen el pardeamiento de las hojas de la yerba mate, y el tiempo necesario de inversión en agua para tener su inactivación a temperaturas que variaron entre 80 y 100ºC. Los mismos resultaron en unos pocos minutos. Simultáneamente, se patentó un equipo industrial para el zapecado con agua caliente. El mismo tiene un tiempo de residencia de un minuto utilizando agua que está entre 90 y 95ºC. Se realizaron ensayos, de los cuales el establecimiento obtuvo un producto que sensorialmente resultó apto para el consumo, pero no se realizaron ensayos de calidad sobre el mismo, así mismo, no se evitó el contacto con humos ya que posterior al zapecado con agua, se continuó con el secado tradicional tipo cinta en contacto directo con gases de combustión, proceso que condiciona considerablemente el contenido de benzo-a- pirenos en la yerba mate. Las pruebas en planta piloto permitieron eliminar de manera confiable por debajo de los límites detectables estos compuestos, obteniendo un producto libre de humo (Thea, 2016).

En los últimos tiempos, se incrementaron los motivos que llevaron a buscar procesos alternativos. En primer lugar, algunos mercados cuestionaron el consumo de yerba mate por el contacto directo de los gases de combustión de leña con el producto, detectándose niveles elevados de benzo (a) pirenos (Thea et al., 2014). Respecto este problema (presencia de benzo (a) pirenos en el producto), se ensayaron algunas alternativas principalmente en la etapa de zapecado, ya es muy difícil alcanzar las temperaturas utilizadas (400-500 ºC) calentando aire en forma indirecta. En la etapa de secado, que trabaja con temperaturas cercanas a los 100ºC, es posible utilizar aire caliente con calentamiento indirecto. Se realizaron ensayos de zapecado utilizando diferentes métodos: Zapecado con agua caliente, zapecado con vapor y procesamiento integral con microondas (zapecado + secado). La calidad fisicoquímica de los productos obtenidos con métodos alternativos se comparó con muestras paralelas procesadas con el método tradicional (muestras obtenidas en contacto directo con gases de combustión de chip de madera). (Alegre et al., 2014; Holowaty et al. 2014b).

Sin embargo, un aspecto fundamental y preponderante en la calidad de la yerba mate es la aceptación sensorial de los consumidores (Surkan et al., 2009; de Godoy et al., 2013; Orjuela-Palacio, 2014). La implementación de métodos alternativos en el procesamiento de yerba mate puede influir en las propiedades organolépticas, comenzando por la ausencia de humos en el proceso (Thea, 2016), así como la conservación de algunas propiedades funcionales o compuestos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si existen diferencias, utilizando análisis sensorial, en las muestras procesadas con métodos alternativos en comparación a muestras obtenidas por el método tradicional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se tomaron tres grupos de muestras de yerba mate. Se muestrearon en dos días no consecutivos en un establecimiento industrial de la Provincia de Misiones. En todos los casos se tomaron 2 muestras de cada tipo de proceso por cada día de trabajo, es decir, muestras por cuadruplicado, ya que las mismas se

destinarían a análisis fisicoquímicos y al final a pruebas sensoriales. El tamaño de cada muestra consistió en 4 a 6 kg de ramas. El primer grupo procesado fue el método tradicional (MT) que serviría como referencia para comparar al zapecado con agua (MA). Se tomaron ramas zapecadas por contacto directo, método que se describe en la sección anterior y ramas zapecadas con agua caliente (provenientes de un prototipo de la misma industria, que utiliza un intercambiador de calor para calentar agua entre 90 y 95ºC) provenientes del mismo lote. Para el segundo grupo de muestras se tomaron ramas verdes que serían zapecadas con vapor en planta piloto (MV), utilizando vapor saturado a 2 atm (121ºC), y las del método tradicional (MT) que sirvieron de referencia a este tipo de procesamiento alternativo. El tercer grupo de muestras corresponde a procesamiento integral con microondas (MO). Para ello se tomaron 4 muestras de ramas verdes del mismo volumen que en los casos anteriores. Con ellas se procedió al secado con microondas a escala laboratorio. Para comparar con el método de referencia, se tomaron muestras de yerba mate procesada íntegramente con chip en el establecimiento industrial, del mismo lote destinado a secado con microondas (MT). Se obtuvieron en total 4 muestras de yerba mate canchada de aproximadamente 1,5 – 2 kg para cada tipo de procesamiento alternativo (MA, MV y MO) y a su vez 4 muestras de procesamiento con chip como referencia para cada alternativa (12 muestras procesadas con chip, 4 por cada proceso alternativo). Ningún grupo de muestras tuvo contacto entre si luego de la toma en la planchada de hoja verde del establecimiento.

Secado post-zapecado

Todas las muestras tomadas en el establecimiento industrial se colocaron en bolsas de polietileno tipo consorcio y se trasladaron a la planta piloto de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), donde se realizó el secado en un secadero de lecho fijo (Figura 1). Todas las muestras se secaron por separado (entre 3 y 4,5 horas) a 100 ºC, a una velocidad de aire promedio de 2,5 m/s, hasta un contenido de humedad inferior al 4 % en base seca. El tiempo de secado varió según el tipo de zapecado al cual fueron sometidas las ramas (Alegre et al., 2014).

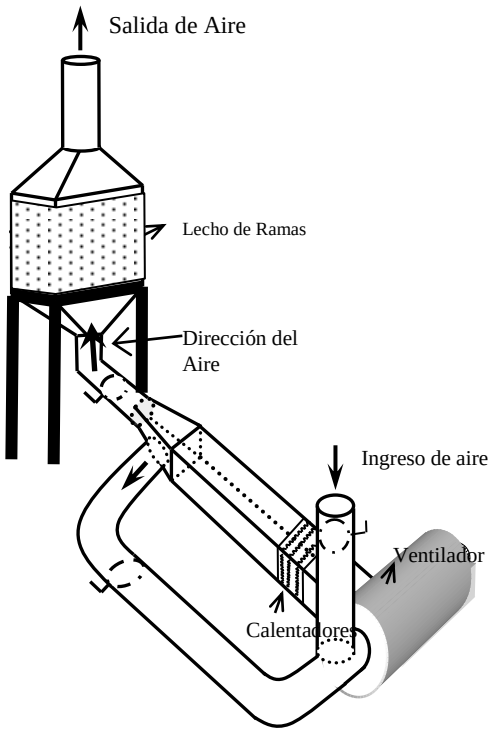


Figura 1. Esquema del secadero de planta piloto utilizado en las experiencias de secado.

Preparación de la yerba mate

Luego del secado, se separaron las hojas y los palos para obtener una mezcla con 20% de palo, se procedió a la molienda de las mismas a fin de obtener yerba mate canchada (molienda gruesa), a excepción de las muestras procesadas con chip que sirvieron de referencia para el procesamiento con microondas, las cuales se tomaron secas y canchadas del establecimiento industrial. Las muestras se conservaron a -20ºC, lo que evitaría cambios fisicoquímicos y organolépticos hasta el momento en que pudieran someterse a estacionamiento.

Estacionamiento

Durante esta etapa se produce la maduración de la yerba mate. La misma produce cambios organolépticos en la yerba mate que, luego de un período de tiempo adecuado, catadores expertos indican que está lista para el consumo. En el caso del presente trabajo, se implementó una cámara perfectamente aislada de dimensiones aproximadas 1,2 m de ancho x 0,60m alto x 0,60 m profundidad y con capacidad interna de 15 kg de yerba mate canchada junto a un sistema de control de humedad y temperatura(**Figura 2**). Se implementó un controlador con 2 canales que media continuamente a través de un sensor y una termocupla la humedad y temperatura, respectivamente, dentro de la cámara. La yerba mate canchada obtenida de cada procesamiento se colocó en bolsas de polietileno tejidas, similares a la industria, y se estacionó durante 40 días, cada tipo por separado. Se realizaron controles de humedad de producto y de sabor cada 10 días.

El controlador envía una señal al sistema de encendido/apagado del calentador de la cámara, en caso que la temperatura supere o esté por debajo del rango de trabajo (55º C ± 2ºC). Así mismo, el quipo envía otra señal al sistema de calentamiento de agua en el caso que los valores de humedad relativa (HR) salgan de los límites inferior o superior (55% ± 2% HR). Además se colocó un ventilador para circulación interna así uniformar en todos los puntos de la cámara los parámetros controlados, el cual está encendido en todo momento que dura el proceso.

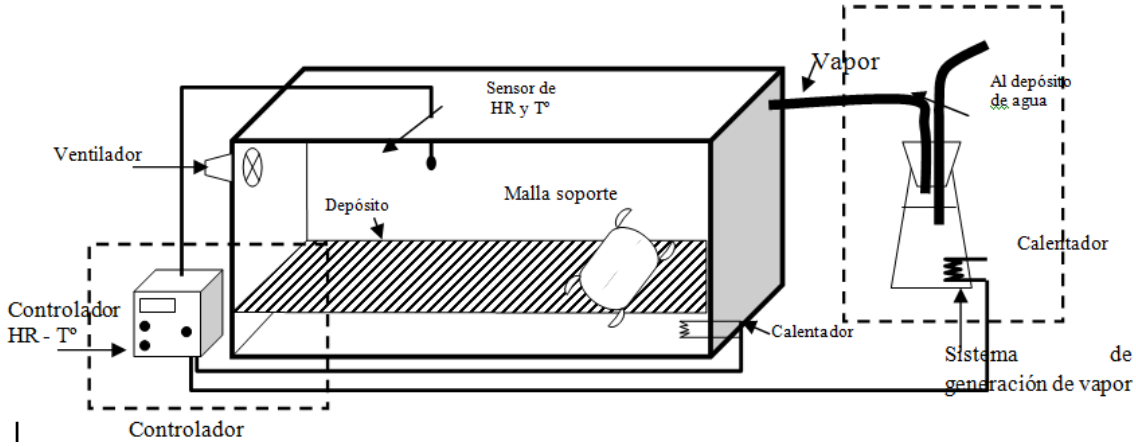


Figura 2. Diagrama esquemático de la cámara de estacionamiento acelerado a escala laboratorio.

Molienda fina

Luego del estacionamiento se realizó la mezcla de cada lote y el cuarteo. Se molió en malla 40, obteniendo la granulometría apropiada para realizar la extracción simulando el consumo del mate.

Obtención de muestras para análisis sensorial

Las pruebas sensoriales se realizaron sobre el extracto obtenido en forma de mateada, tal como se muestra en la **Figura 3**.

Figura 3. Obtención del extracto simulando un mate cebado.

Dos horas antes de las pruebas sensoriales, se utilizó un mate con yerba, se agregó agua y mediante vacio se extrajo el líquido, el que se depositó en un kitasato. Cada extracción se realizó con 50 g de yerba mate molida y 500 mL de agua caliente a 70ºC. Para cada tipo de muestra se obtuvieron 4 L de extracto que se conservaron en dos erlenmeyers de 2000 mL entre 58ºC y 60ºC durante un máximo de 2 horas hasta el momento de la prueba. El uso de extractos permitió analizar concentraciones medias del mismo, y uniformizar las muestras entre catadores. De esta manera se pretendió eliminar el efecto del tipo de cebado, volumen de agua utilizado en cada cebada, temperatura no uniforme, tiempo entre mateadas, etc.

Análisis Sensorial

Las pruebas se realizaron mediante test del triángulo, el cual consiste en presentar al panelista o catador tres muestras incógnitas, una de las cuales es diferente. Se compararon los pares de muestras MT – MA, MT – MV y MT – MO. Las pruebas se realizaron en tres módulos en tres días diferentes, en cada módulo se evaluó un par de muestras. De las pruebas participaron 40 consumidores habituales de mate, todos pertenecientes a la Universidad Nacional de Misiones entre 22 y 60 años. A cada panelista se le presentó una bandeja con 3 vasos codificados en forma aleatoria que contenían aproximadamente 150 ml del extracto a 53 ± 2ºC, como se muestra en la **Figura 4**. También se le dio la posibilidad de repetir la prueba (con una nueva distribución de muestras). Luego de probar las mismas en forma consecutiva debía indicar cual resultó diferente. Además, se dio la posibilidad de comentar en que aspectos consideraba las diferencias (amargo, sabor residual, etc.) (**Figura 5**). Cada prueba duró aproximadamente 5 minutos. Del primer módulo MT – MA se obtuvieron 42 pruebas. En el segundo módulo se comparó entre muestras zapecadas con vapor y zapecadas con chip, se obtuvieron 54 pruebas. Por último, se realizaron las comparaciones entre muestras procesadas con microondas y procesadas con chip de las cuales se obtuvieron 66 pruebas voluntarias.

Figura 4. Presentación de la prueba sensorial para cada participante.

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha: _____

Las muestras que probará son extractos de yerba mate similares a mate cocido.

Pruebe cada muestra sucesivamente, de izquierda a derecha. Antes de cada muestra enjuague la boca con agua 1 ó 2 veces. Luego indique que muestra es diferente marcando con una X.

Bandeja Nº _____:

Muestras: ..... _____ ..... _____ ..... _____

(Indique el número)

Comentarios y observaciones: (Si quiere puede comentar acerca de si le resultaron agradables, o desagradables las muestras y porqué)

Figura 5. Plantilla modelo de test del triángulo utilizada en la prueba sensorial.

Análisis Estadístico

Los datos del test de triángulo se evaluaron mediante pruebas estadísticas con el valor de Z a dos colas para un α = 0,05, las cuales permitieron obtener información si existieron o no diferencias significativas entre muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 1** muestra los aciertos, la proporción y el valor p, en relación al Z encontrado por tabla para la comparación de cada par. Se determinó que solamente el par zapecado con agua y zapecado con chip existen diferencias significativas entre las muestras MA y MT. Se realizaron en este caso, 42 pruebas, de los cuales 25 resultaron correctas, es decir, que notaron diferencias entre el método de procesamiento con agua y procesamiento con el método tradicional, esto representa el 59,5% de los casos, con un p valor menor a 0,0001. Los panelistas comentaron que algunos extractos resultaron más "fuertes" es decir, mas amargos, y en otros casos notaron que todavía faltaba maduración, para el caso de yerba zapecado con agua, esto puede ser posible ya que 40 días de estacionamiento son el límite inferior para la maduración de las muestras. Los catadores no encontraron desagradables las muestras zapecadas con agua, y en algunos casos hicieron notar que resultaba con mejor sabor que las muestras zapecadas con chip.

En la comparación MV versus MTV, se acepta que las muestras no tienen diferencias estadísticas entre si, y que de 54 pruebas solamente 24 resultaron aciertos, es decir el 44,4% notó diferencias, el p-valor resultó cercano al límite de confianza utilizado de 0,05. Diez catadores que acertaron en las pruebas, notaron que la yerba MV, tenía un aroma a yerba húmeda, y resultó amarga. Además, notaron el sabor a "tostado" de la yerba mate procesada con el método tradicional.

Por último, las comparaciones del par MO – MTM fue la que mostró menor diferencia estadística, y de 66 pruebas, 25 fueron aciertos, representando el 37,9%. Sin embargo, en varias ocasiones los catadores han observado la intensidad del amargo en las muestras y dentro del grupo que realizó aciertos, los catadores expertos que participaron como consumidores habituales, notaron el sabor ahumado de las tradicionales. Aunque estos resultados no afectaron al análisis estadístico. La obtención de extractos por el mate simulado fue utilizado por otros autores (Scipioni et al., 2010) para caracterizar la concentración de solubles y parámetros fisicoquímicos, así también, en pruebas sensoriales se caracterizaron el grado de estacionamiento y atributos de sabor (acidez, amargo, astringencia y dulzor) (Surkan et al., 2012; Holowaty et al., 2014c). El efecto del "primer mate" puede sobrepasar el umbral superior de los sabores, lo cual podría interferir en la decisión del panelista.

Tabla 1. Resultados del análisis comparativo estadístico mediante la prueba Z.

Comparación	Aciertos	Totales	Proporción (A/T)	Proporción Teórica	P
MA - MTA	25	42	0,595	0,333	0,0001
MV -MTV	24	54	0,444	0,333	0,0700
MO - MTM	25	66	0,379	0,333	0,4010

Cuando un atributo sensorial es intenso o elevado, en ocasiones puede superar o estar en torno al umbral superior del mismo. Se han encontrado muestras de ello, en comentarios anexos a las pruebas sensoriales, con referencia, sobre todo, a la intensidad del amargo. Si bien existen pocos antecedentes sobre aceptabilidad sensorial de yerba mate como infusión ya sea por el agregado de hierbas u otras sustancias (como minerales) en relación al consumo tradicional, algunos estudios mencionan la posibilidad de la saturación de zonas gustativas a elevadas concentraciones de sólidos solubles (Scipioni et al., 2010). Orjuela-Palacio et al., (2014) realizaron pruebas para evaluar la aceptabilidad de bebidas a base de yerba mate con alto contenido de polifenoles, en los cuales consideraron la posibilidad de que en el test de

triangulo no se aprecien diferencias entre muestras por el efecto de la saturación en las zonas gustativas del sabor amargo. Deladino et al. (2013) analizó el efecto del atributo amargo y la acidez en sopas enriquecidas con extractos de yerba mate, sin embargo, utilizó bajas concentraciones de extracto, con lo cual las notas de amargo y flavor característico de la yerba mate no fueron significativos.

CONCLUSIONES

Al comparar sensorialmente yerba mate obtenida con el procesamiento tradicional y otros métodos alternativos nuevos de procesamiento (zapecado con agua caliente o vapor y secado y procesamiento con microondas) utilizando el método del triángulo, se encontró que los consumidores detectaron diferencias en solo un caso, el procesamiento con agua versus el tradicional. En ninguna de las comparaciones los consumidores manifestaron encontrar sabores desagradables. De esta forma, el procesamiento tradicional, que pone en contacto al producto con gases de combustión que pueden resultar contaminantes, se puede reemplazar por otros métodos en los que el producto no tiene contacto con humos. Estos resultados se pueden considerar importantes debido a que la yerba mate es un producto en el que el consumidor es poco proclive a aceptar cambios en el sabor.

BIBLIOGRAFIA

Alegre AC, Holowaty SA, Schmalko ME. 2014. Cinética de secado de yerba mate con diferentes pre-tratamientos. Libro de resúmenes del V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Córdoba, Argentina. ISBN 978-987-45738-5-8 CP:68

de Godoy RC, Deliza R, Gheno LB, Licodiedo S, Frizon CN, Ribani RH y dos Santos GG. 2013. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. Food Research International, 53, 801-807. doi:10.1016 /j.foodres.2013.02.054

Deladino L, Navarro AS, Martino MN. 2013. Carrier systems for yerba mate extract (Ilex paraguariensis) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. LWT - Food Science and Technology. Vol. 53. Issue 1, p 163-169.

Gomez Vara ME, Brieux JA y Avanza JR. 1979. Investigaciones sobre la tecnología de la Yerba Mate-Informe APRYMA, 1-226

Holowaty SA, Alegre AC, Bohazcenko EA y Schmalko ME. 2014b. Influencia de distintos tipos de zapecado en las propiedades fisicoquímicas de la yerba mate. Libro de resúmenes del V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Córdoba, Argentina. CP:68 ISBN 978-987-45738-5-8.

Holowaty SA, Surkan SA, Trela VD, Byczko GD y Schmalko ME. 2014c. Variation of Physicochemical and Sensory Properties during the Aging of Yerba Mate. International Journal of Food Studies. ISSN: 2182-1054. V3 – p. 228-238.

Holowaty SA, Thea AE, Bohazcenko EA, Schmalko ME. 2014a. Efecto del combustible empleado en el procesamiento de la yerba mate sobre la calidad. Libro de resúmenes del V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Córdoba, Argentina. 17-19/11/2014. CP:71 ISBN 978-987-45738-5-8.

Orjuela-Palacio JM, Zamora MC, Lanari MC. 2014. Consumers' acceptance of a high-polyphenol yerba mate/black currant beverage: Effect of repeated tasting. Food Research International 57, p 26-33.

Sabatella PO, Pokolenko JJ y Schmalko ME. 2009. Influencia de la composición en la extracción de los solubles de la yerba mate. En: Revista Ciencia y Tecnología 11 (a): 42-47.

Schmalko M y Alzamora S. 2005. Modeling the drying of a Twig of “Yerba Maté” considering as a composite material: Part I: Shrinkage, Apparent density and Equilibrium moisture content. Journal of Food Engineering 66, pp. 455-461.

Schmalko M y Alzamora S. 2001. Color, chlorophyll, caffeine and water content variation during Yerba Maté processing. Drying Technology 19, p. 599-610.

Scipioni GP, Ferreyra DJ, Acuña, MG y Schmalko ME. 2010. Rebaudioside A release from matrices used in a yerba maté infusion. En: Journal of Food Engineering 100: 627-633.

Surkan SA, Albani O y Ramallo LA. 2009. Influence of Storage Conditions of Sensory Shelf Life of Yerba

Mate. Journal of Food Quality 32, 58-72.
Surkan SA, Byczko GD, Schmalko, ME. 2012. Variaciones del sabor de la yerba mate para tres tipos de estacionamiento. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Actas. ISBN-13: 978-987-28845-0-5.Digital. p 621.
Thea A, Ferreira D, Brumovsky L, Schmalko M. 2014. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en infusiones preparadas con yerba mate ilex paraguariensis st. Hillarie), Memorias del VI Congreso Sudamericano de la yerba mate y II Simposio Internacional de yerba mate y salud. ISBN: 978-9974-0-1085-7. (en CD).
Thea AE 2016. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) de origen argentino: Influencia del procesamiento y contenido en las diferentes formas de consumo. Tesis del Doctorado en Ciencias Aplicadas - Universidad Nacional de Misiones.
Xander CG, Acosta LM, Scipioni, GP y Argüello B. 2000. Inactivación térmica de peroxidasas en Ilex paraguariensis St. Hil. y dumosa. Anales del 2° Congreso Sul-Americano da Erva-Mate, Encantado 19 al 23/11/00, Brasil, 366-369.

Desarrollo, análisis sensorial y caracterización física y química de mermelada con jugo de naranja

Irusta S. M.[1], Ríos R.S.[1]

(1) Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires. Junín, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Las mermeladas son elaboradas por cocción de frutas frescas con azúcar. El objetivo del trabajo fue desarrollar una mermelada de banana con jugo de naranja, inexistente en el mercado de la zona del Noroeste de la provincia de Buenos Aires y evaluar sus características físicas, químicas y sensoriales. Se probaron distintas formulaciones, hasta obtener un producto de consistencia untuosa, color agradable y dulce. Se trituró banana, se adicionó jugo de cítrico, se homogeneizó con almíbar y se llevó a cocción durante 30 minutos a 80-85°C a pH entre 2,0 - 3,6. Se fraccionó en caliente en envases de vidrio. Se caracterizó física y químicamente mediante grados Brix (65 °Brix), pH (3,41), acidez (0,40% g/g), actividad acuosa (0,94) y viscosidad (1,5 cm de escurrimiento totales). El perfil sensorial se elaboró con descriptores seleccionados por 11 evaluadores semi entrenados mediante prueba descriptiva. Por medio de una prueba de aceptabilidad sensorial, 72 consumidores cuantificaron cada atributo según su apreciación sobre una escala hedónica. La formula de mermelada fue: banana (51,33%), azúcar (25,66%), jugo de naranja (18,73%) y agua (4,28%). Resultó ser caracterizada física y químicamente y aceptada, con alta intención de compra (98,61%). Este producto innovador, permitirá aumentar el consumo de frutas.

Palabras clave: Mermelada, banana, análisis sensorial, grados Brix.

ABSTRACT

Jams are produced by cooking fresh fruit and sugar. The aim was to develop banana marmalade with orange juice, nonexistent in the market of the Northwest zone of the province of Buenos Aires, and evaluate its physical, chemical and sensorial characteristics. Different formulations were tested in order to obtain a product of unctuous consistency, nice colour and not too sweet. Mashed bananas with the addition of citrus juice, homogenized with syrup and finally cooked at 80-85 °C at pH 2.0 to 3.6 for 30 minutes. It was fractionated hot in glass containers. It was characterized physically and chemically by brix (65 °Brix), pH (3.41) Acidity (0.40% g/g), water activity (0.94) and viscosity (1.5 cm total runoff). The sensorial profile was elaborated with descriptors selected by 11 semi trained testers through a descriptive test. Through a test of sensorial acceptability, 72 consumers quantified each attribute according to their appreciation over a hedonic scale. The jam formula was: banana (51.33%), sugar (25.66%), orange juice (18.73%) and water (4.28%). This banana jam turned out to be physically and chemically characterized and accepted, with a high purchase intention (98.61%). This innovative product will increase fruit consumption.

Keywords: Marmalade, banana, sensory analysis, Brix.

INTRODUCCIÓN

El consumo total de frutas y vegetales de la población argentina es aproximadamente la mitad que la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y descendió en las últimas dos décadas. En 2012/13 los argentinos consumimos 41% menos frutas y 13% menos vegetales que en 1996-97 (Zapata, et al 2016). En ningún período el consumo alcanzó los 400 g diarios que recomienda la OMS.

Una de las consecuencias más importantes del no consumo de frutas en niños es la obesidad preescolar y escolar, así como también muchas enfermedades crónicas no transmisibles como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cánceres como en la cavidad oral, esófago, estómago, colon y recto (Ortiz 2011).

Las mermeladas son una alternativa rica y saludable para el consumo de frutas en los desayunos o meriendas, pero los más chicos y hasta los adolescentes, no suelen elegir este tipo de producto. Sin embargo, la fruta de preferencia, en general, de este grupo es la banana; por lo tanto una interesante opción a plantear, para aumentar el consumo de frutas, es una mermelada de este fruto que en este momento no existe en el mercado de la zona del Noroeste de la provincia de Buenos Aires.

Las mermeladas en general se componen de frutas, azúcares, pectinas y ácido cítrico. La banana es una fruta de gran valor nutritivo. En su composición destaca su riqueza en hidratos de carbono (20% de su peso). Es pobre en proteínas y lípidos, aunque su contenido en estos componentes supera al de otras frutas como manzana, pera y durazno (Mataix y Pérez llamas, 2002).

En cuanto a las vitaminas, la banana contiene cantidades apreciables de provitamina A y vitaminas del grupo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina y piridoxina (B6); y es una buena fuente de ácido fólico y vitamina C (Pamplona 1999). Es, además un fruto muy rico en potasio y magnesio. De hecho, es una de las frutas con mayor contenido en estos minerales. Además, provee una cantidad de sodio muy baja (Pamplona 1999).

La banana es, por tanto, un alimento nutritivo y energético. La mermelada de banana resulta una alternativa para aumentar la conservación del fruto sin perder la mayoría de las características nutricionales que se aprecian del mismo. El jugo de naranja aporta ácidos que son importantes para la gelificación de la mermelada, mejora el sabor y ayuda a evitar la cristalización del azúcar.

El objetivo del trabajo fue desarrollar una mermelada de banana con jugo de naranja, inexistente en el mercado de la zona del Noroeste de la provincia de Buenos Aires y evaluar sus características físicas, químicas y sensoriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

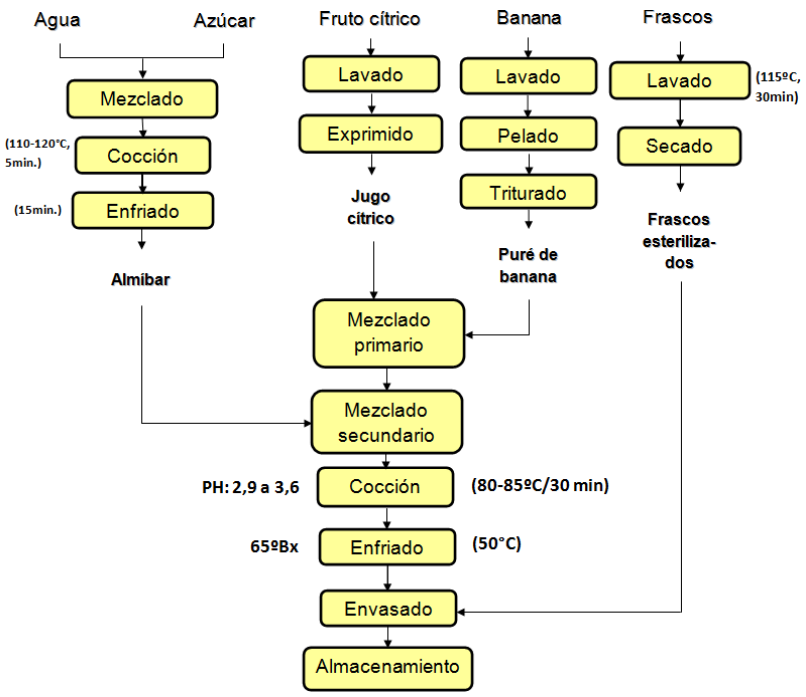
Se probaron diferentes formulaciones en las que se variaron tipo y proporciones de ingredientes, para obtener un producto de consistencia untuosa, color similar al de la banana y dulce. Los ingredientes que se modificaron fueron: banana, azúcar, agua, vainilla, juegos de limón y de naranja en las proporciones que se muestra la **tabla Nº1**.

Ingrediente	**Formulación 1**	**Formulación 2**	**Formulación 3**	**Formulación 4**	**Formulación 5**
Banana	51,55%	60,68%	70,69%	70,69%	51,33%
Azúcar	38,67%	30,34%	21,21%	21,21%	25,66%
Agua	6,44%	5,05%	3,53%	3,53%	4,28%
Jugo de limón	3,34%	3,93%	4,57%	4,57%	-
Jugo de naranja	-	-	-	-	18,73%
Vainilla	-	-	-	2 gotas cada ½ Kg prod.	-

Tabla N°1. Formulaciones realizadas para la obtención del producto.

Preparación de las muestras

El proceso de elaboración de las muestras consistió en la preparación de un triturado de banana al que se le adicionó inmediatamente jugo de cítrico exprimido. Luego se le agregó el almíbar, se mezcló hasta homogeneidad y se llevó a cocción durante 30 minutos a 80-85°C a pH entre 2,0 y 3,6. Finalmente se fraccionó en envases estériles de vidrio en caliente (70°C) y se almacenó hasta ser analizada. A continuación se detalla el diagrama de flujo de dicho proceso (Esquema N° 1).



Esquema N°1. Proceso de elaboración de las muestras a escala laboratorio.

Análisis sensorial

El perfil sensorial se elaboró con descriptores seleccionados por un grupo de 11 evaluadores semi entrenados que realizaron una prueba descriptiva. Se utilizó la norma IRAM 22015 (2002) "Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial por el método multidimensional", que corresponde a la norma ISO 11035 (1994) y la norma IRAM 20001 (2012) "Análisis sensorial. Vocabulario" que se corresponde con la norma ISO 5492. Las muestras se presentaron a los evaluadores en bandejitas plásticas con cucharitas descartables.

El grado de aceptabilidad del producto se determinó por prueba de aceptabilidad sensorial (norma ISO 11136 2014). Los evaluadores fueron 72 consumidores a los cuales se le entregó la muestra untada sobre una tostada ("Riera tradicional") en platos descartables individuales junto con una planilla sobre la cual cuantificó su apreciación respecto a cada atributo del producto mediante una escala hedónica de cinco valores.

Caracterización físico química

Los grados brix se midieron con un refractómetro manual (Hand Held Refractometer de Pasteur SRL). A una solución homogeneizada de 10 g de mermelada en 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente se determinó pH mediante método potenciométrico con un peachímetro (Checker). Para la determinación de acidez se utilizó el método que consiste en una titulación acido base (referencia: AOAC 947.05 2000).

La actividad acuosa se midió con un equipo analizador automático (Aqua Lab®) y la viscosidad se cuantificó mediante la adaptación de un método utilizado para hidrocoloides. Se colocaron 20,00 ± 0,01g de muestra en el cristalizador. Tapando el recipiente con la hoja milimetrada plastificada, se volcó rápidamente y se levantó el recipiente. Se midieron los milímetros de flujo de la muestra a lo largo del tiempo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Composición centesimal

La humedad se determinó por gravimetría en estufa de vacío a 95ºC (AOAC 945.38B. 2000).

El contenido de proteínas se determinó por método de Kjeldhal usando un factor de conversión de 6,25 y se expresó como gramos de proteínas por 100 g de alimento húmedo (AACC 46-12 1995).

Las cenizas se determinaron por carbonización en mechero y calcinación en mufla a 525ºC (AOAC 945.38C.

2000).
Los contenidos de fibras alimentarias, grasas saturadas y trans se calcularon de forma teórica utilizando los valores proporcionados por las tablas de la página "Alimensuras. Se obtuvieron los contenidos sumando el valor de nutriente que aporta cada uno de los ingredientes (azúcar, jugo de naranja y banana), según las proporciones en las que se encuentran en 100 g de mermelada. El contenido de grasas se calculó de igual manera, utilizando los valores proporcionados por las tablas de "argenfoods" realizadas por la Universidad Nacional de Luján.
Los hidratos de carbono asimilables se calcularon por diferencia, y el valor energético se calculó aplicando los factores de conversión correspondientes.
El contenido de sodio se cuantificó mediante espectrometría de absorción en un equipo Analizador por absorción atómica nuclear Marca PerkinElmer.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para seleccionar la mermelada de mayor aceptación se evaluaron los siguientes parámetros: aspecto, aroma, color y grado de dulzor. En base a esto se seleccionó la formulación 5, por presentar las mejores características organolépticas para el producto mermelada. El sabor cítrico particular de la naranja permitió reemplazar el sabor fuerte de la banana por uno de mayor aceptación, fresco y frutal. La tonalidad naranja realzó el color y el brillo. El estado menos maduro de la fruta colaboró en la disminución del gusto dulce y mejoró el color. La mayor cantidad de pectinas presentes aumento la viscosidad de la mermelada. En **tabla Nº 2**, se muestra la formulación elegida.

INGREDIENTES	***PROPORCIONES (%)***
Banana	*51,33%*
Azúcar	*25,66%*
Agua	*4,28%*
Jugo de naranja	*18,73%*

Tabla Nº 2. Proporciones porcentuales de fórmula final

Descriptores seleccionados

El panel de jueces semi entrenado estuvo compuesto por un total de 11 personas.
Los descriptores seleccionados por el panel fueron:

- Color global

Puede ser analizado como dos atributos diferentes, desglosando los componentes del color (Tono: característico de la banana caramelizada a una determinada longitud de onda; Luminosidad: grado de intensidad (claro-oscuro) del color característico del producto)

- Brillo

Propiedad de una superficie lustrosa que muestra una reflexión luminosa.

- Uniformidad del producto

Homogeneidad de la pasta. Presencia uniforme de trozos de fruta de tamaños diferentes repartidos equitativamente en todo el producto.

- Olor a banana

Es el estímulo percibido como característico de la muestra cuando se acerca a la nariz.

- Intensidad de olor

Es la fuerza del estímulo percibido por encima de la muestra cuando se acerca a la nariz.

- Intensidad de flavor

Fuerza del estímulo percibido a nivel del bulbo olfativo y en la cavidad bucal, provocada por la liberación de compuestos volátiles dentro de las mismas.

- Flavor a banana

Es el estímulo percibido característico a nivel del bulbo olfativo y en la cavidad bucal, propio de la banana.

- Flavor a naranja

Es el estímulo percibido característico a nivel del bulbo olfativo y en la cavidad bucal, propio de la naranja.

- Dulzor

Describe el gusto básico producido por la disolución acuosa de sacarosa.

- Persistencia de flavor

Duración en el tiempo del estímulo percibido a nivel del bulbo olfativo y la cavidad bucal luego de la deglución del producto (30 segundos como máximo).

- Untabilidad

Facilidad con la que el producto se distribuye sobre una superficie.

- Consistencia
- Resistencia que ofrece el producto al flujo y a la deformación cuando está sometido a la fuerza gravitatoria.

Perfil sensorial

Definidos los descriptores, se confeccionó una planilla con los atributos seleccionados para evaluar el producto y determinar el perfil sensorial.

En una planilla de Excel se registró el número correspondiente al casillero que marcó el panelista, se determinó el promedio para cada atributo y se llevó a cabo la representación del perfil del producto mediante gráfico araña que se presenta a continuación (**Figura 1**).

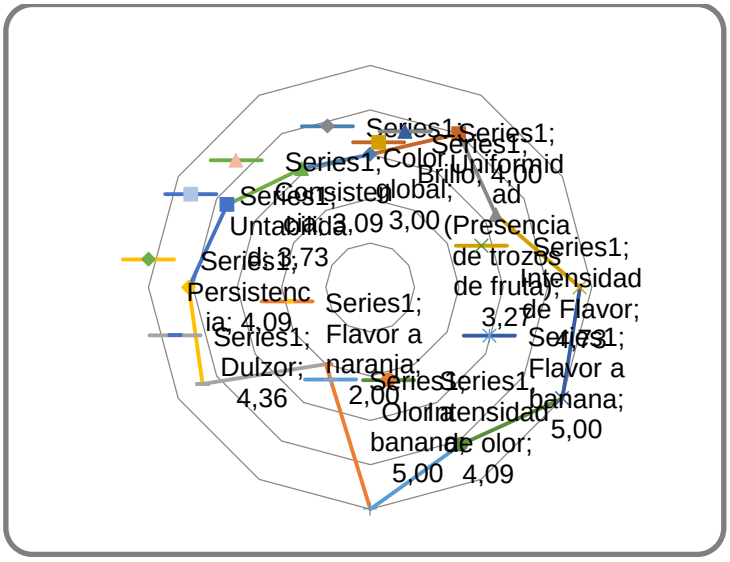


Figura 1. Resultado del análisis de descriptores.

Del gráfico se observa que, la mermelada de banana con jugo de naranja resultó ser un producto con:

- Color global: Amarillo pardo claro.
- Brillo: Mermelada brillosa. En ambos atributos los evaluadores coincidieron en un ciento por ciento
- Uniformidad (Presencia de trozos de fruta): Se determinó que la mermelada presentó homogeneidad

de la pasta, con la presencia uniforme de trozos de fruta de tamaños diferentes repartidos equitativamente en todo el producto tendiendo a presentar algunos trozos de mayor tamaño.

- Intensidad de Flavor: Los evaluadores determinaron que el producto tiene un flavor entre muy intenso e intenso, tendiendo principalmente a "muy intenso".
- Flavor a banana: El panel semi-entrenado coincidió en que el flavor a banana es "alto".
- Intensidad de olor: se determinó que el olor de la mermelada es "intenso".
- Olor a banana: Los evaluadores coincidieron en que el olor a banana es "alto".
- Flavor a naranja: El flavor a naranja resultó ser "casi imperceptible".
- Dulzor: La mermelada fue definida como "muy dulce".
- Persistencia del flavor: La persistencia del flavor fue determinada como "persistente".
- Untabilidad: El producto resultó ser "untable".
- Consistencia: Los evaluadores consideraron a la consistencia como "algo fluida".

Prueba de aceptabilidad del producto

Se encuestaron un total de 72 consumidores. Con los datos de las encuestas se confeccionó una tabla de números correspondientes al casillero marcado por el consumidor en la planilla.

Los porcentajes de cada uno de los datos socio-culturales y de cada una de las preguntas sobre los atributos de la mermelada, fueron volcados en los gráficos de las **figuras 2** y **3** respectivamente.

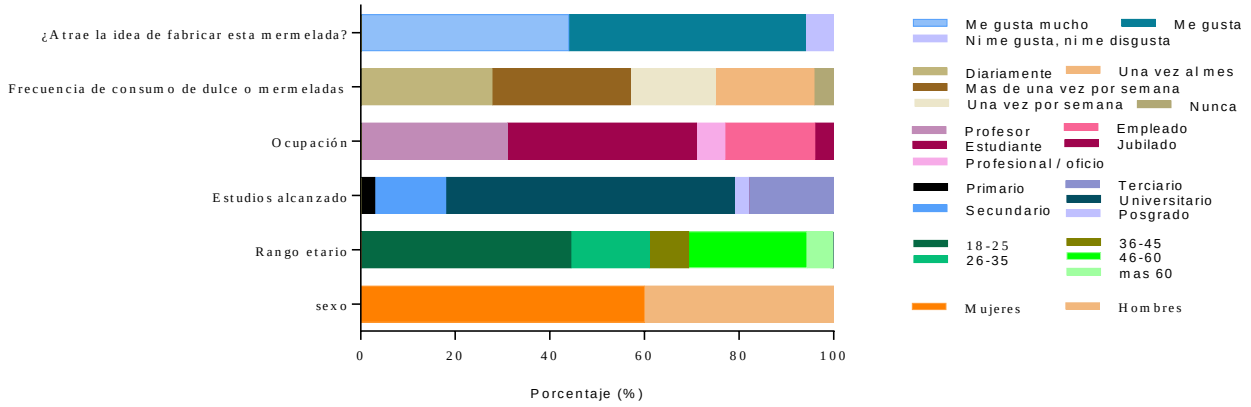


Figura 2. Porcentaje de los datos socioculturales

En la **figura 2** se observa que, en el total de setenta y dos personas encuestadas, la cantidad de mujeres supero a la de hombres en un veinte por ciento y en cuanto a edades, el rango que comprende entre 18 y 25 años fue el que se presentó con mayor frecuencia seguido por el rango de 46 a 60 años. La causa por la cual se obtuvieron dichos resultados, se debe a que en su mayoría, fueron encuestadas personas pertenecientes a universidades y escuelas. Por el mismo motivo, la ocupación de las mismas principalmente fue estudiantes o docentes.

La frecuencia de consumo de este tipo de producto, fue elevada que va desde todos los días (27,78%) a más de una vez por semana (29,17%). Al ser un producto que no se encuentra habitualmente en el mercado, no se puede hablar de frecuencia de consumo en particular y por lo tanto se decidió evaluar cuanto le atrae al consumidor la idea de la fabricación de éste tipo de mermelada. Los resultados de la escala hedónica fueron favorables, obteniéndose cero por ciento para “me digusta” y “me disgusta mucho” y un porcentaje de 44% para “me gusta mucho” y 50% para “me gusta” .

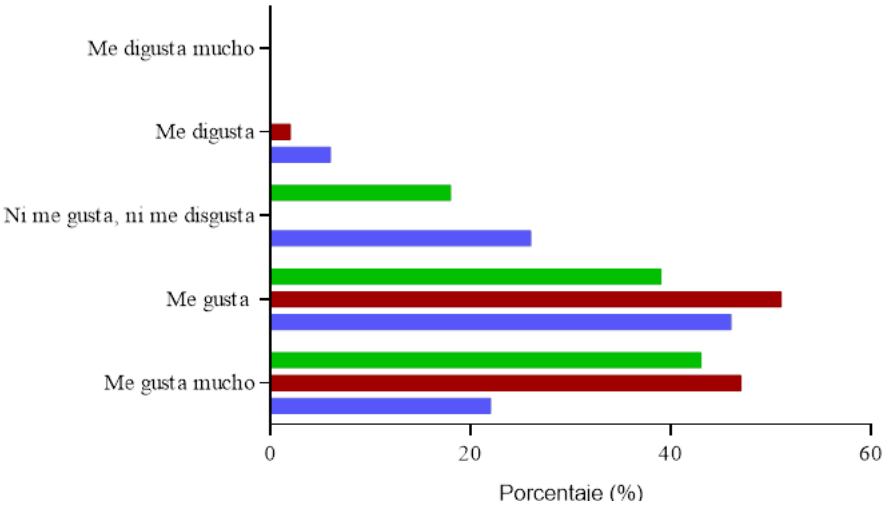


Figura 3. Porcentaje de la evaluación de los atributos de la mermelada.
Color; Aroma y sabor; Textura en general.

El atributo color (**Figura 3**) mostró una clara discrepancia entre los consumidores, como se ve reflejado en el 26% de las personas que indicaron que no les gustaba ni les disgustaba. Varios consumidores consideraron que el color claro era el esperado para un producto de este tipo debido a la naturaleza de la materia prima; otros declararon su disconformidad respecto al color, el cual les resultó oscuro.
A pesar de esto, una gran mayoría estuvo conforme, como lo expone el porcentaje de 46% para el valor de la escala hedónica "me gusta" y un 22% para el valor "me gusta mucho".
A juzgar por los valores y comentarios obtenidos para los atributos olor y sabor, claramente el producto superó las expectativas de los consumidores, presentando un 47% para el valor hedónico "me gusta mucho" y un 51% para "me gusta". Dicho resultado se ve justificado en los comentarios, donde los consumidores expresaron su agrado respecto al olor y sabor que les resultaron característicos de la materia prima y bien definidos.
El atributo textura también presentó diferencias entre las opiniones de los consumidores ya que algunos expresaron conformidad basándose en el hecho de que se trata de un producto natural, mientras que otros reflejaron su disconformidad comparando el producto con las mermeladas comerciales que posen gomas, por lo que tienen mayor consistencia de gel y que no presentan trozos o pulpa como los productos caseros.
Sin embargo la mayoría indicó que le gustaba mucho la textura del producto (43%) y otro gran porcentaje que le gustaba (39%) totalizando así un 82% de aceptación en este atributo. Las diferencias se reflejaron en el porcentaje 18% que expresó que no le gusta ni le disgusta éste atributo.

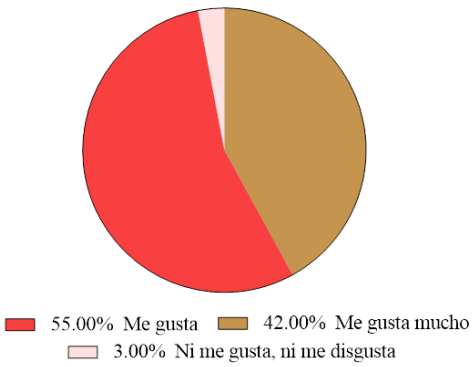


Figura 4. Sensación post-degustación. **Figura 5**. Cantidad de azúcar.

Puede verse en la **figura 4**, como los consumidores se expresaron conformidad con el producto, en cuanto a la sensación post-degustación, tanto en los valores arrojados por las encuestas como en los comentarios. Para el punto de la escala "me gusta mucho" se obtuvo una respuesta del 42%, mientras que un 55% de los consumidores reflejó su sensación con el punto "me gusta".
La percepción de la cantidad de azúcar se encuentra muy condicionada por las costumbres alimenticias y el gusto de cada persona en particular, como puede verse en los comentarios en donde algunos expresan que, por ejemplo, el contenido de azúcar es elevado pero es de su agrado mientras que para otros no lo es.
De todos modos, por los valores de la escala hedónica se puede decir que a la gran mayoría de los consumidores (86%) les gustó la cantidad de azúcar del producto, indicado por un 35% para el valor de la escala "me gusta mucho" y un 51% para "me gusta". (**Figura 5**) No se puede dejar de considerar aquellos consumidores que expresaron "ni me gusta ni me disgusta" (11%), mientras que no resultó significativo el valor "me disgusta" indicado por un 2% de los consumidores.
Hasta aquí se consideró por separado cada uno de los atributos del producto, por lo cual se decidió sugerirle al consumidor que asigne un puntaje, en una escala del 1 al 10, evaluándolo en su totalidad, es decir, englobando y combinando todos y cada uno de los aspectos considerados anteriormente de manera individual. De esta forma se obtuvo un puntaje promedio de 8,76 para la mermelada como producto global.
Es evidente que los consumidores están dispuestos a comprar el producto ya que el porcentaje con intención de compra es de un 98,61% para los encuestados. Esto último es reafirmado por la afirmación de compra y los comentarios realizados por los mismos al concluir la encuesta.

Características físicas y químicas del producto terminado

La **tabla N°4** de características físicas y químicas del producto final en estudio se obtuvo con los promedios de los datos experimentales.

Determinaciones	**Valores promedios y desvíos estándar obtenidos**
Grados Brix (ºBrix)	65,0 ± 0,5
pH	3,41 ± 0,02
Acidez (% p/p expresado en ácido cítrico)	0,4 ± 0,1
Actividad acuosa	0,94 ± 0,01
Viscosidad (cm totales)	1,5 ± 0,1

Tabla N°4. Valores de las características físicas y químicas obtenidos.

El valor promedio obtenido de 65,0 °Brix, (65 g de sólidos solubles cada 100 g de muestra) es el esperado para una mermelada de estas características y el exigido por el Código Alimentario Argentino para la denominación de este producto (CAA Cap. X Artículo 810 - (Res 1027, 22.10.81)).
El pH arrojó un valor promedio de 3,41, se encuentra dentro de los límites para una mermelada (pH 2,9-3,6) (Navarrete E. 2016).
El valor de acidez 0,4 g de ácido de ácido cítrico cada 100 g de muestra; considerando al ácido cítrico, como el que se encuentra en mayor concentración en la muestra. Según la bibliografía consultada del depósito de documentos de la FAO (Figuerola, 1997), la mermelada debe tener una acidez del 1% para favorecer la formación del gel con pectina.
El valor promedio 0,94 de aw corresponde a un alimento de una elevada actividad de agua, como lo son las mermeladas en general, que deben su conservación a factores como la osmolaridad, la temperatura y la acidez y no así a la disponibilidad de agua.
Observando los resultados se puede considerar que la mermelada es considerablemente viscosa al punto tal que presenta sólo 1,5 cm de escurrimiento total en la prueba de viscosidad.

Rotulado Nutricional

Porción: 20 g (1 cucharada sopera), porciones por envase: Aprox. 23.		
	Cantidad por porción	**%VD(*)**
Valor/Cont. Energético	53Kcal (223KJ)	2
Carbohidratos	11g	3
Proteínas	0,0g	0
Grasas Totales	0,9g	1
Grasas saturadas	0g	0
Grasas trans	0g	-
Fibra alimentaria	0g	1
Sodio	4mg	1

Tabla Nº 5. Tabla Nutricional de la mermelada.

El valor promedio de humedad (36,9%) en la muestra de estudio es cercano al de otras mermeladas elaboradas con otro tipo de frutas (Ej.: mermelada de frutillas: 22% de humedad. Fuente: "Argenfoods"). No hay bibliografía para comparar el valor obtenido, por tratarse de un producto nuevo en el mercado.
El contenido de cenizas de 0,79%, se correlaciona con la cantidad de cenizas que contiene la banana que es aproximadamente 0,8%.
Como se muestra en la **tabla Nº 5**, el valor calórico, contenido de carbohidratos y los porcentajes de valor diario recomendado por porción responden a una mermelada.
El porcentaje de proteínas (0,2%), Grasas saturadas (0,06% por cálculo) son valores bajos que se conciernen a este tipo de producto a base de fruta.
La fibra alimentaria (2%) y los lípidos (4,4%) los aporta en su mayor proporción la fruta banana.
Los ingredientes de la mermelada son de origen vegetal, no se sometieron a procesos de muy alta temperatura como ser el fritado, tampoco a procesos de hidrogenación y al no encontrarse bibliografía que diga lo contrario, se consideró un valor de 0 g de grasas trans por porción
La cantidad de sodio determinada por absorción atómica, se corresponde a un 1% en valores dietarios recomendados, por lo que se encuentra dentro de un límite aceptable.

CONCLUSIONES

El producto mermelada de banana con jugo de naranja, logró ser caracterizado física y químicamente, mediante grados Brix, pH, acidez, actividad acuosa y viscosidad.
Se logró obtener una tabla nutricional del producto para el rotulado del mismo.
Con respecto al aspecto sensorial, se logró generar una buena cantidad de descriptores y así la descripción sensorial de la mermelada fue muy completa y, en ella, se cumplieron los objetivos relacionados al desarrollo del producto. En relación a la prueba de aceptabilidad en consumidores, los resultados obtenidos fueron muy positivos. La mermelada posee una buena calidad sensorial de modo que presenta una alta aceptación con buena intención de compra (98,61% de los consumidores), cumpliendo las expectativas e invitando a pensar de manera optimista en la inserción del producto en el mercado.
La mermelada a base de banana permitirá una mayor conservación de la fruta que la compone, se lo considera un producto innovador en el mercado y nutritivo.

BIBLIOGRAFÍA

American Association of Cereal Chemists. Approved. Methods. Vol. II 9º edtion. 1995
ARGENFOODS. Base de Datos de Composición de Alimentos. Universidad Nacional de Lujan. Pagina

Web: http://www.argenfoods.unlu.edu.ar.
Código Alimentario Argentino (CAA), Ley 18.284. Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos, capítulo X: Alimentos Azucarados y capítulo XII: bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Página web:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
Comparación en frutas, Manzana-Damasco-Durazno-Ciruela-Banana (s.f.). Fecha de consulta: 15 de Diciembre 2015. Página web: www.alimensuras.wordpress.com
Depósito de documentos de la FAO (s.f.). "Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas". Departamento de Agricultura. Fecha de consulta: 9 de Diciembre del 2015. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/006/y4893s/y4893s06.htm
Depósito de documentos de la FAO. MANUAL TECNICO. Figuerola F., Paltrinieri G. (1997). "Procesamiento a pequeña escala de frutas y hortalizas amazónicas nativas e introducidas". Capítulo 4.3. Mermeladas, jaleas, jarabes, dulces y confituras. Página web: http://www.fao.org/docrep/x5029s/x5029s00.htm
Información nutricional del plátano (s.f.). Fecha de consulta: 15 de diciembre del 2015. Página web: http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional-de/platano/
Mataix J, Pérez llamas F (2002). Frutas, verduras y hortalizas. En: Nutrición y Alimentación Humana. Tomo I. Nutrientes y Alimentos. Mataix J (ed.). Ergón Madrid. pp. 292-309
Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC Internacional) 2000. 17th edition. Maryland. USA.
Navarrete E. (s.f.) Mermeladas de frutas y cítricos. Fecha de consulta: 15 Marzo del 2016. Página web: http://oneproceso.webcindario.com/Mermeladas.pdf
Norma IRAM 20001 (2012) "Análisis sensorial. Vocabulario" - ISO 5492.
Norma IRAM 22015 (2002) "Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial por el método multidimensional." - ISO 11035 (1994) "Sensory analysis -- Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach".
Norma ISO 11136 (2014) "Sensory analysis -- Methodology -- General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area".
Ortiz Estefanía M. (2011). Las frutas esenciales que necesitan los niños. Consecuencias por no consumir frutas. Publicado el 26 de Mayo del 2011. Consultado el: 16 de Marzo del 2016. Página web: http://frutasesencialesenlosninos.blogspot.com.ar/2011/05/importancia-de-las-frutas-en-los-ninos.html
Pamplona JD (1999). Enciclopedia de los Alimentos y su poder curativo. 1ª Edición. Tomo 2. Biblioteca Educación y Salud. Editorial Safeliz. T1 p21, T2 p43-45.
Picallo Alejandra (2014), docente de la materia Análisis Sensorial de Alimentos de la UNNOBA. Comunicación personal.
Zapata ME, Rovirosa A, Carmuega E 2016 En prensa. "Cambios en el patrón de consumo de alimentos y nutrientes en las últimas dos décadas en argentina."

AGRADECIMIENTOS
A mi directora: Mg. Ing. Silvina Ríos, por su tiempo, dedicación y valiosa orientación para la realización del presente trabajo.
A la docente Dra. María José Torres y personal del laboratorio de la UNNOBA Junín por su ayuda incondicional en la realización de las formulaciones y demás pruebas.
A los docentes y personal de la UNLu por el préstamo de los equipos y la realización de las determinaciones de actividad de agua, proteínas y sodio.

Cambios en los hidratos de carbono de granos de quínoa (*Chenopodium quinoa*) producidos por la germinación

Jiménez M.D.[(1)], Lobo M.O.[(1)], Segundo C.[(1)], Sammán N.[(1)]

(1) Facultad de Ingeniería, CIT Jujuy CONICET-Universidad Nacional de Jujuy
Ítalo Palanca Nº10, San Salvador de Jujuy, Argentina
doloresjimenez4@gmail.com

RESUMEN

La germinación puede mejorar las características nutricionales de los granos sin embargo, también puede afectar las propiedades de las harinas como consecuencia de la degradación de macronutrientes. El objetivo del trabajo fue estudiar la influencia que tiene la germinación en el contenido relativo de las diferentes fracciones de carbohidratos de la quínoa. Se trabajó con tres variedades de granos, las cuales fueron germinadas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Se determinó composición proximal, contenido de almidón resistente y digerible; fibra insoluble y soluble; relación amilosa-amilopectina, azúcares totales y reductores; y propiedades térmicas de almidones por calorimetría diferencial de barrido. En granos germinados se incrementó el contenido de azúcares reductores y totales, producidos probablemente por hidrólisis parcial del almidón digerible; el almidón total disminuyó y el contenido de amilosa aparente aumentó. El contenido de fibra total e insoluble aumentó en las tres variedades. Las temperaturas de gelatinización y retrogradación fueron similares para almidones de granos germinados y sin germinar. Los cambios producidos por la germinación en los carbohidratos pueden resultar beneficiosos nutricionalmente por mejorar el aporte y digestibilidad de nutrientes y desfavorables tecnológicamente por la reducción del contenido de almidón total.

Palabras claves: quínoa, germinación, carbohidratos, gelatinización, retrogradación.

ABSTRACT

Germination can improve the nutritional characteristics of grains, however it may also affect flour properties as a result of macronutrients degradation. The aim of this work was to study the influence of the germination process in the relative content of the different fractions of carbohydrates in quinoa grain. Three varieties of quinoa grain were used; they were germinated under controlled conditions of temperature and humidity. Proximate composition, content of resistant and digestible starch; insoluble and soluble fiber; amylose-amylopectin ratio; total and reducing sugars; and thermal properties of starches by differential scanning calorimetry were determined. In sprouted grains, content of total and reduced sugar was increased, probably as a consequence of partial hydrolysis of digestible starch; total starch decreased and the content of apparent amylase increased. The content of total and insoluble fibers increased in the three varieties. The temperatures of gelatinization and retrogradation were similar to starches of quinoa grains with and without germinating. The changes produced in the carbohydrates by the germination can be nutritionally beneficial by improve digestibility of nutrients, but technologically unfavorable by the reduction of total starch content.

Keywords: quinoa, germination, carbohydrates, gelatinization, retrogradation.

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son los componentes mayoritarios en una dieta balanceada, cuya función principal es el aporte de energía (Lunn y Buttriss 2007). Una dieta equilibrada debe estar constituida por el 45-65% de carbohidratos, 20-35% de grasas y 10-35% de proteínas (Otten et al. 2006). Los carbohidratos aportados por los alimentos incluyen al almidón, los azúcares y la fibra (Lunn y Buttriss 2007).

El almidón es un polisacárido de reserva alimentaria predominante en los productos de origen vegetal y es una de las principales formas de hidratos de carbono en la dieta. Se compone de dos polisacáridos, amilosa y amilopectina, y la relación entre ambos afecta en gran medida las propiedades funcionales del almidón. En la formulación de alimentos, éste cumple diversas funciones tales como espesante, mejorador de la textura, ligante del agua, interviniendo en la estructura y estabilidad de los alimentos, entre otras (Jane et al. 1999; Singh et al. 2003; Lajolo y Menezes 2006; Madruga et al. 2014). Los almidones digeribles son degradados por las enzimas digestivas en el intestino delgado en moléculas de glucosa; mientras que el almidón resistente se opone a la digestión y pasa al intestino grueso, lo que tiene numerosos beneficios para la salud (Lunn y Buttriss 2007). Los azúcares son absorbidos en el intestino y pasan al torrente sanguíneo, donde son utilizados para proporcionar energía al organismo (Lunn y Buttriss 2007). Por otro lado, la fibra pasa a través del sistema digestivo sin ser digerida; se clasifica en fibra soluble e insoluble (o fermentable y no fermentable), y ambas juegan un importante papel en la salud. La fibra soluble puede ser usada por las bacterias lácticas intestinales y por lo tanto actuar como prebiótico, favoreciendo la formación de flora bacteriana beneficiosa. También se une a las grasas favoreciendo su eliminación y disminuyendo las lipoproteínas de baja densidad (LDL); produce saciedad y ayuda a mantener los niveles de azúcar en sangre; por otro lado la fibra insoluble resiste la acción de los microorganismos intestinales, y su principal función es ayudar a regularizar el tránsito intestinal (Lunn y Buttriss 2007).

La quínoa (*Chenopodium quinoa*) es un importante grano andino extensamente cultivado en América del Sur. Es una buena fuente de proteínas y lípidos de buena calidad, vitaminas y minerales (Vega-Gálvez et al. 2010), almidón (Ruales y Nair 1994), fibra (Ruales y Nair 1994; Repo-Carrasco-Valencia and Serna 2011) y compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y antirradicalaria (Repo-Carrasco-Valencia et al. 2010). En la actualidad, es ampliamente usada para la elaboración de alimentos tales como fideos (Chillo et al. 2008), panes (Mendoza-Pérez y Palacios-Morales 2013, Stikic et al. 2012), aperitivos (Taverna et al. 2012), suplementos-productos alimenticios y papillas para bebes (Cerezal Mezquita et al. 2007, Cerezal Mezquita et al. 2011), entre otros.

Con la germinación de granos puede modificarse la composición nutricional, obteniéndose una mejora en el aporte, digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes (Lintschinger et al. 1997, Park and Morita 2004, Chaparro et al. 2010, Omary et al. 2012, Hager et al. 2014) incrementando el aporte de compuestos fenólicos con un aumento en la actividad antioxidante (Alvarez-Jubete et al. 2010, Carciochiet et al. 2014, Kaur et al. 2016), disminución en los niveles de antinutrientes (como el ácido fítico) y azúcares (Omary et al. 2012) pero esto puede afectar también las propiedades funcionales de las harinas (Atwell et al. 1988).

El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios que se producen en los carbohidratos de tres variedades de quínoa durante la germinación; evaluar cambios en los contenidos de fibra, azúcares y almidón, y relación amilosa-amilopectina, los que pueden afectar de manera significativa las propiedades reológicas de los productos elaborados con las harinas como la viscosidad, capacidad de retención de agua y digestibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y acondicionamiento de la materia prima

Se trabajó con tres variedades de quínoa (Cica, Kamiri e Inga Pirca) procedentes de la estación experimental IPAF-INTA-Hornillos (Jujuy, Argentina). Los granos se lavaron, despalillaron por flotación y desaponificaron mediante lavados sucesivos con agua a temperatura ambiente, luego se secó en estufa de circulación forzada a 50ºC y se molió hasta obtener harina de quínoa (Tamiz 18).

Para obtener la harina germinada, los granos se lavaron, desaponificaron y remojaron en agua a temperatura ambiente por 6 h, incubando a continuación en estufa, por 24 h bajo condiciones controladas: T=22-24ºC, H=80-90%, en oscuridad; transcurrido el tiempo de incubación se secó en estufa de circulación forzada a 50ºC y se molió de igual manera que los granos sin germinar.

Las harinas obtenidas fueron almacenadas en bolsas al vacío a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Composición centesimal

Se determinó, mediantes técnicas oficiales AOAC (2016): Humedad (AOAC 32.1.03, Método 925.10),

Cenizas (AOAC 32.1.05, Método 923.03), Proteínas (AOAC 27.1.26, Método 920.53), Lípidos (Método Soxhlet, James 1999) y Carbohidratos totales por la suma de fibra total, almidón total y azúcar total.

Contenido de fibra soluble, insoluble y total

El contenido de fibra soluble, insoluble y total se determinó con el método Megazyme (AOAC 985.29, 32-05-01; 991.42, 32-06-01; 991.43, 32-07-01; 993.19, 32-21-01) que consiste en incubar la muestra a 98ºC con α-amilasa para gelatinizar, hidrolizar y depolimerizar el almidón; incubar a 60ºC con proteasa para solubilizar las proteínas; e incubar con amiloglucosidasa a 60ºC para hidrolizar fragmentos de almidón a glucosa. A continuación, se filtró la solución y se lavó con agua, obteniendo así dos fracciones; el residuo, del cual se determinó la fibra insoluble y la solución filtrada, de la que se determinó la fibra soluble, ambos corregidos por el contenido de proteínas y cenizas.

Contenido de almidón resistente, digerible y total

El almidón resistente y los compuestos solubles, se determinaron con método Megazyme (AOAC 2002.02, 32-40-01). Las muestras se incubaron con α-amilasa pancreática, conteniendo amiloglucosidasa (AMG) en un baño de agua con agitación durante 16 h a 37°C. Durante este proceso, se solubiliza el almidón no resistente y se hidroliza a D-glucosa por la acción combinada de las dos enzimas. La reacción termina mediante la adición de etanol y el almidón resistente se recupera por centrifugación; a continuación, éste se lava dos veces con solución de etanol/agua (50% v/v), seguido de centrifugación; el líquido libre se elimina por decantación. El sedimento (almidón resistente) se disuelve en 2 M KOH por agitación vigorosa en un baño de hielo sobre un agitador magnético; esta solución se neutraliza con tampón acetato y el almidón se hidroliza a glucosa con AMG; la D-glucosa se mide mediante el agregado de reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa (GOPOD) a 510 nm (medida del almidón resistente). Por otro lado, el almidón no resistente (almidón solubilizado o digerible) se determina, junto con los demás compuestos solubles, por lectura a 510 nm, del contenido de D-glucosa con GOPOD.

2.5. **Contenido de azúcares reductores y total**

Se determinó en las muestras de harinas con el método del dinitrosalicilico (DNS) (Miller 1959); se fundamenta en la hidrólisis del azúcar en medio alcalino lo que produce un compuesto que reduce a un grupo nitro del DNS para dar el producto monoamino correspondiente (producto coloreado), el cual se mide en espectrofotómetro a 540 nm. Para determinar la curva de calibración se empleó diferentes diluciones de glucosa.

El azúcar total se determinó hidrolizando la sacarosa de las muestras con ácido clorhídrico 20% en baño de agua hirviendo por 15 min, luego neutralizando con NaOH 2% con fenolftaleína y procediendo a continuación de igual manera que para determinar azúcares reductores. Para trazar la curva patrón se emplearon diferentes diluciones de sacarosa.

Aislado de almidón

Las harinas fueron desgrasadas con éter de petróleo. Luego se extrajeron las proteínas por solubilización a pH 9 y centrifugación a 9000 g y 5ºC por 20 min; el precipitado resultante se suspendió en agua destilada, se neutralizó, se lavó con bisulfito de sodio en forma sucesivas (1,2g/L) y se filtró en paño fino de algodón para finalmente recuperar el almidón decantado en papel de filtro en embudo Büchner y sucesivos lavados con agua y alcohol 96%. El almidón suspendido y húmedo, se secó en estufa a 50ºC y se trituró en mortero.

Relación amilosa-amilopectina

Se determinó en los almidones aislados con el método descripto por Juliano (1981), el cual se fundamenta en la medición espectrofotométrica, a 620 nm, del complejo que se forma entre el iodo y la amilosa. La curva patrón se determinó con soluciones de amilosa-amilopectina de papa de alta pureza.

Comportamiento térmico de los almidones

La gelatinización de los almidones aislados se estudió en un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Q2000. Se emplearon cápsulas Tzero Pan con tapas TzeroHermetic Lid de aluminio, en las cuales se pesaron 2 mg de almidón y 10 mg de agua destilada; se dejó en reposo durante 1 h y se realizaron las corridas en el DSC en modo estándar, en un rango de 25 a 95ºC, con una rampa de 10ºC/min. Para analizar la retrogradación se analizaron las muestras anteriores conservadas en heladera a 4ºC durante 21 días, bajo las mismas condiciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Geminación

La capacidad germinativa en todos los casos superó el 90%, alcanzando una longitud de radícula de 1,5-2,0cm.

Composición centesimal

En la **Tabla 1** se muestra el contenido de macronutrientes de las tres variedades de quínoa y sus germinados. Se observa que el contenido de proteínas se incrementó en las variedades Cica y Kamiri mientras que los lípidos se redujeron, manteniéndose invariables ambos macronutrientes en la variedad Inga Pirca. Estos valores son comparables con los reportados por otros autores (Valcárcel-Yamani y Lannes 2012, Omary et al. 2012). El aumento proteico podría deberse a la biosíntesis de proteínas enzimáticas y cambios de composición por degradación de otros constituyentes (Ghavidel y Prakash, 2007; Devi et al., 2015) y la reducción lipídica puede producirse por el uso de los lípidos como fuente de energía, contribuyendo a la actividad catabólica, durante la germinación (Ghavidel y Prakash, 2007; Rumiyati et al., 2012; Devi et al., 2015). El contenido de cenizas presentó un leve aumento luego de la germinación en todos los granos estudiados, lo cual coincide resultados de otros autores (Ghavidel yPrakash 2007, Chaparro et al. 2011, Omary et al. 2012, Bravo et al. 2013), posiblemente por los minerales contenidos en el agua con la que se lavaron y remojaron los granos (Suma y Urroj, 2014).

Tabla 1. Composición proteica, lipídica y de cenizas de las harinas (g/100g bs)

Muestra	Cenizas	Proteínas	Lípidos
Quinua Cica	2,16±0,10	12,74±0,31	7,48±0,14
Quinua Cica Germinada	2,26±0,01	14,31±0,14	5,61±1,94
Quinua Kamiri	2,36±0,02	12,97±0,22	6,53±0,18
Quinua Kamiri Germinada	2,58±0,14	15,78±0,12	5,99±0,08
Quinua Inga Pirca	2,25±0,02	14,95±0,24	6,75±0,27
Quinua Inga Pirca Germinada	2,37±0,02	14,00±0,31	6,79±0,05

Almidón resistente, digerible y total

El almidón resistente disminuyó con la germinación en las variedades Cica e Inga Pirca 32 y 11% respectivamente, y se mantuvo constante en la variedad Kamiri; estos valores son acordes a los informados por González-Soto (2006). Por otro lado, el almidón soluble presentó disminución en todas las variedades (de 96; 61 y 81%, para las variedades Cica, Kamiri e Inga Pirca respectivamente). La disminución en el contenido de almidón resistente y soluble, se refleja en una reducción del almidón total producido por la hidrólisis durante la germinación (**Tabla 2**) lo que coincide con lo estudiado por otros autores (Bravo et al. 2013, Hager et al. 2014), quiénes también observaron disminución en el contenido de almidón y acumulación simultánea de glucosa y fructosa después de 24 y 36 horas, lo que indica una movilización de las reservas de almidón.

Tabla 2. Composición de almidón en las harinas (g/100g bs)

Muestra	Almidón Total	Almidón Resistente	Almidón Soluble
Quinua Cica	43,38±0,49	0,71±0,01	42,67±0,98
Quinua Cica Germinada	2,02±0,36	0,48±0,01	1,55±0,71
Quinua Kamiri	45,06±0,36	0,57±0,01	44,49±0,72
Quinua Kamiri Germinada	17,91±0,35	0,59±0,11	17,32±0,59
Quinua Inga Pirca	40,60±0,43	0,70±0,02	39,90±0,84

Quinua Inga Pirca Germinada	7,98±0,34	0,62±0,02	7,37±0,65

Azúcares reductores y totales

Los azúcares reductores y totales se incrementaron con la germinación, probablemente por hidrólisis parcial del almidón, particularmente del digerible, por acción de la α y β amilasa (**Tabla 3**). Los resultados son semejantes a los reportados por Repo-Carrasco (1992) y Hager et al. (2014).

Tabla 3. Composición de azúcares en las harinas (g/100g bs)

Muestra	Azúcar Total	Azúcares reductores
Quinua Cica	17,58±0,25	5,41±0,47
Quinua Cica Germinada	52,28±0,77	29,73±1,18
Quinua Kamiri	14,05±0,09	4,42±0,05
Quinua Kamiri Germinada	35,57±0,75	34,02±0,87
Quinua Inga Pirca	14,73±0,14	4,75±0,17
Quinua Inga Pirca Germinada	42,98±0,60	42,75±1,52

Fibra soluble, insoluble y total

El contenido de fibra total e insoluble aumentó durante la germinación en las tres variedades, permaneciendo invariable la fibra soluble. Estas variaciones se debieron principalmente al aumento de la estructura celular durante la germinación por modificaciones que se producen en los polisacáridos (Rumiyati et al., 2012). El incremento de fibra total fue de 9; 8 y 17 % para las variedades Cica, Kamiri e Inga Pirca respectivamente (**Tabla 4**). Los contenidos de fibra total fueron similares a los valores obtenidos por otros autores (Repo-Carrasco-Valencia and Serna 2011, Valcárcel-Yamaniand Lannes 2012, Quinto et al. 2015), y los de fibra total, soluble e insoluble son comparables con los de Ando et al. (2002).

Tabla 4. Contenido de fibra en las harinas (g/100g bs)

Muestra	Fibra Total	Fibra insoluble	Fibra Soluble
Quinua Cica	11,83±0,51	7,99±0,46	3,85±0,56
Quinua Cica Germinada	12,92±0,32	9,37±0,28	3,55±0,36
Quinua Kamiri	11,62±0,35	7,91±0,25	3,71±0,45
Quinua Kamiri Germinada	12,61±0,89	8,86±0,94	3,75±0,85
Quinua Inga Pirca	12,29±0,54	9,02±0,29	3,28±0,79
Quinua Inga Pirca Germinada	14,40±1,17	11,85±1,32	2,55±1,01

Relación amilosa-amilopectina

El contenido de amilosa de los granos sin germinar, son similares a los informados por Atwell et al. (1983), Lorenz et al. (1990), Assad-Bustillos et al. (2014) y Egas et al. (2010). El contenido de amilosa aparente aumentó, lo que correspondería a un incremento en el contenido de dextrinas formadas durante la germinación por fraccionamiento de las cadenas ramificadas de amilopectina (**Tabla 5**).

Tabla 5. Contenido de amilosa (g/100 g almidón)

Muestra	Amilosa
Quinua Cica	9,4
Quinua Cica Germinada	14,2
Quinua Kamiri	7,4
Quinua Kamiri Germinada	12,3
Quinua Inga Pirca	7,8

Quinua Inga Pirca Germinada	8,7

Comportamiento térmico de los almidones

Las temperaturas de gelatinización de los granos, son acordes a lo que obtuvieron otros autores (Atwell et al. 1983, Ruales and Nair 1994, Ya Quian et al. 1999, Ando et al. 2002, Arzapalo et al. 2015). Durante la germinación no se observó modificación del comportamiento térmico de los almidones; las temperaturas de inicio, pico y final, y la entalpía de los eventos de gelatinización y retrogradación fueron similares para almidones de granos germinados y sin germinar (**Tabla 6**).

Tabla 6. Comportamiento térmico de los almidones

Muestras de almidones	**Gelatinización**				**Retrogradación**			
	Ti (ºC)	**Tpico (ºC)**	**Tf (ºC)**	**ΔH (J/g)**	**Ti (ºC)**	**Tpico (ºC)**	**Tf (ºC)**	**ΔH (J/g)**
Quinua Cica	58,94	62,83	75,00	6,86	37,77	50,88	82,43	0,66
Quinua Cica Germinada	58,48	62,81	75,27	7,63	39,42	51,15	82,74	1,05
Quinua Kamiri	58,63	63,11	75,00	8,39	38,94	51,02	82,75	1,13
Quinua Kamiri Germinada	57,55	62,18	75,09	8,74	39,72	51,68	82,68	1,43
Quinua Inga Pirca	58,94	63,40	75,00	8,31	41,15	53,82	82,43	1,40
Quinua Inga Pirca Germinada	57,51	61,95	75,27	8,53	38,79	51,22	82,74	1,51

CONCLUSIONES

La germinación de quínoa produjo cambios en la composición centesimal, con una mejora del aporte proteico. Se produjeron cambios en el contenido de azúcares reductores y totales, en el contenido de almidón resistente y total, y en la fibra total e insoluble. También se modificó la relación amilosa:amilopectina.

La germinación produjo hidrólisis del almidón, lo cual podría aumentar su digestibilidad.

Los cambios producidos no modificaron el comportamiento térmico de los almidones; las harinas de granos germinados y sin germinar presentan temperaturas similares de cocción y estabilidad frente a la retrogradación.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt EK, Gallagher E. 2010. Food Chemistry 119, 770–778. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buck wheat and wheat as affected by sprouting and baking.

Ando H, Chen YC, Tang H, Shimizu M, Watanabe K, Mitsunaga T. 2002. Food Components in Fractions of Quinoa Seed. Food Sci. Technol. Res., 8 (1), 80–84.

AOAC, Association of Oficial Analytical Chemists-Methods of Analysis. 2016. http://www.aoac.org/.

Arzapalo Quinto D, Huamán Cóndor K, Quispe Solano M, Espinoza Silva C. 2015. Extracción y caracterización del almidón de tres Variedades de quinua (C*henopodium quinoa willd*) negra Collana, pasankalla roja y blanca Junín. Rev. Soc. Quím. Perú, 81(1).

Atwell WA, Hyldon RG, Godfrey PD, Galle EL, Sperber WH. 1988. Germinated Quinoa Flour to reduce the viscosity of starchy foods. Cereal Chem. 65 (6): 508-509.

Atwell WA, Patrick BM, Johnson LA y Glass RW. 2011. Characterization of Quinoa starch. Cereal Chem,. 60(1), 9-11.

Bravo M, Reyna R, Gómez Sánchez P y Huapaya H. 2013. Estudio químico y nutricional de granos andinos germinados de quinua (*Chemopodium quinoa*) y kiwicha (*Amarantus caudatus*). Rev. Per. Quím. Ing. Quím,, Vol. 16 Nº1, 54-60.

Bravo MA, Reyna JR, Gomez Sánchez IP, Huapaya MH. 2013. Estudio químico y nutricional de granos andinos germinados de quínoa (*Chenopodium quinoa*) y kiwicha (*Amarantus caudatus*). Rev. Per.Quím. Ing.Quím. Vol. 16 Nº1, Pags. 54-60.

Carciochi RA, Manrique GD, Dimitrov K. 2014. Changes in phenolic composition and antioxidant activity during germination of quínoa seeds (*Chenopodium quinoa Willd*). International Food Research Journal 21(2): 767-773.

Cerezal Mezquita P, Carrasco Verdejo A, Pinto Tapia K, Romero Palacios N, Arcos Zavala R. 2007. Suplemento alimenticio de alto contenido proteico Para niños de 2-5 años. Desarrollo de la formulación y aceptabilidad. Dec., vol. 32 Nº 12.

Cerezal Mezquita P, Urtuvia Gatica V, Ramírez Quintanilla V, Arcos Zavala R. 2011. Desarrollo de producto sobre la base de harinas de cereales y leguminosa para niños celíacos entre 6 y 24 meses; I: Formulación y aceptabilidad. NutrHosp., 26(1):152-160.

Cerezal Mezquita P, Urtuvia Gatica V, Ramírez Quintanilla V, Arcos Zavala R. 2011. Desarrollo de producto sobre la base de harinas de cereales y leguminosa para niños celíacos entre 6 y 24 meses; II: Propiedades de las mezclas. NutrHosp., 26(1):161-169.

Chaparro DC, Pismag P, Correa E, Quila V y Caicedo CA. 2010. Effect of the germination on the protein content and digestibility in amaranth, quinoa, soy bean and grandul seeds. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol. 8, Nº1.

Chillo S, Laverse J, Falcone PM, Del Nobile MA. Quality of spaghetti in base amaranthus whole meal flour added with quinoa, broad bean and chick pea. Journal of Food Engineering 84; 101–107(2008).

Devi C., Kushwaha A. y Kumar A. 2015. Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). J Food Sci Technol 52(10):6821–6827.

Editora da Universidade de São Paulo, p. 646.

Egas 2010. Elaboración de un cereal para desayuno con base a quinua (*Chenopodium quinoa willd*) expandida. Revista tecnológica, vol. 23, Nº 2, 9-15.
Ghavidel R.A. y Prakash J. 2007. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. LWT 40, 1292–1299.
González-Soto RA, Sánchez-Hernández L, Solorza-Feria J, Núñez-Santiago C, Flores E Huicochea y Bello-Pérez LA. 2006. Resistant Starch Production from Non-conventional Starch Sources by Extrusion. Food Sci Tech Int., Vol. 12(1):5–11.
Hager AS, Mäkinen OE, Arendt E.K. 2014. Amylolytic activities and starch reserve mobilization during the germination of quinoa. European Food Research and Technology, 239, Issue 4: 621-627.
Jane J, Chen YY, Lee LF, McPherson AE, Wong KS, Radosavljevic M, Kasemsuwan T. 1999. Effects of Amylopectin Branch Chain Length and Amylose Content on the Gelatinization and Pasting Properties of Starch. Cereal Chem. 76(5):629–637.
Juliano BO, Perez CM, Blakeney AS, Castillot D, Kongseree N, Laingnelet B, Lapis ET, Murty VS, Paule CM y Webb BD. 1981. International cooperative testing on the amylose content of milled rice. Starch 33, 157-162.
Kaur I, Tanwar B, Reddy M, Chauhan A. 2016.Vitamin C, total polyphenols and antioxidant activity in raw, domestically processed and industrially processed Indian *Chenopodium quinoa* seeds. Journal of Applied Pharmaceutical Science.
Lajolo FM and Menezes EW. 2006. Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos.
Lintschinger, J, Fuchs N, Moser H, Jäger R, Hlebeina T, Markolin G, and Gössler W. 1997. Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa. Plant Foods Hum. Nutr. 50:223-237.
Lorenz K y Collins F. 1990. Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Starch-Physico-chemical Properties and Functional Characteristics. Starch/starke 42, Nº 3, 81 -86.
Lunn J and Buttriss JL. 2007. Carbohydrates and dietary fiber. British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 32, 21–64.
Madruga MS, Medeiros de Albuquerque FS, Alves Silva IR, Silva do Amaral D, Magnani M, Queiroga Neto V. 2014. Chemical, morphological and functional properties of Brazilian jackfruit (*Artocarpus heterophyllus L.*) seeds starch. Food Chemistry 143: 440–445.
Mendoza-Pérez DG and Palacios-Morales FN. 2013. Elaboración y valoración del hierro en el pan enriquecido con harina de quinua (*Chenopodium quinoa w.*) y soja (*Glycinemax*). Revista Científica de Ciencias de la Salud (ISSN 2306-0603), 6:6.
Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, Vol. 31, Nº3, 426-428.
Omary MB, Fong C, Rothschild J and Finney P. Effects of Germination on the Nutritional Profile of Gluten-Free Cereals and Pseudocereals: A Review. Cereal Chem. 89(1):1–14.
Otten JJ, Hellwig JO, Meyers L.D. 2006. Dietary Referens Intakes (DRI), the Essential Guide to Nutrient Requeriments. Institute of Medicine of National Academies (www.nap.edu). Washington D.C.
Park SH and Morita N. 2004. Changes of bound lipids and composition of fatty acids in germination of quinoa seeds. Food Sci. Technol.Res. 10:303-306.
Paśko P, Bartón H, Zagrodzki P, Gorinstein S, Fołta M, Zachwieja Z. 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. Food Chemistry 115, 994–998.
Repo-Carrasco R. 1992. Andean Crops and Infant Nourishment. Report B 25 Finland: Unive Repo-Carrasco R. 1992. Andean Crops and Infant Nourishment. Report B 25 Finland: University of Helsinki. Institute of Development Studies.
Repo-Carrasco-Valencia R y Serna AL. 2011. Quinoa (*Chenopodium quinoa, Willd*) as a Source of Dietary Fiber and other Functional Components. Ciencia y Tecnologia de Alimentos. Campinas 31(1): 000-000.
Repo-Carrasco-Valencia R, Hellström JK, Pihlava JM, Mattila PH. 2010. Flavonoids and other phenolic

compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Food Chemistry 120, 128–133.

Ruales J y Nair BM. 1994. Properties of starch and dietary fiber in raw and processed quinoa (*Chenopodium quinoa, Willd*) seeds. Plant Foods for Human Nutrition 45: 223-246.

Rumiyati A., James P. y Jayasena V. 2012. Effect of Germination on the Nutritional and Protein Profile of Australian Sweet Lupin (*Lupinus angustifolius L.*). Food and Nutrition Sciences 3, 621-626.

Singh N, Singh J, Kaur L, Sodhi NS, Gill BS. 2003. Morphological, thermal and reological properties of starches from different botanical sources. Food Chemistry, 81, 219–231.

Stikic R, Glamoclija D, Demin M, Vucelic-Radovic B, Jovanovic Z, Milojkovic-Opsenica D, Jacobsen SE, Milovanovic M. 2012. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa Willd*) as an ingredient in bread formulations. Journal of Cereal Science 55 (2012) 132-138.

Suma P.F. y Urooj A. 2014. Influence of germination on bioaccessible iron and calcium in pearl millet (*Pennisetum typhoideum*). J Food Sci Technol 51(5):976–981.

Taverna LG, Leonel M, Mischan MM. 2012. Changes in physical properties of extruded sour cassavastarch and quinoa flour blend snacks Mudançasnas propiedades físicas de snacks extrusados de misturas de polvilhoazedo e farinha de quinoa. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 32(4): 826-834.

Valcárcel-Yamani B, Caetano S, Lannes S. 2012. Applications of Quinoa (*Chenopodium Quinoa Willd*) and Amaranth (*Amaranthus Spp.*) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods. Food and Public Health, Vol. 2(6): 265-275.

Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, Uribe E, Puente L, Martínez EA. 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*), an ancient Andean grain: A review. J.Sci. Food Agric. 90:2541-2547.

Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, Uribe E, Puente L, Martínez EA. 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*), an ancient Andean grain: a review J Sci Food Agric. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.4158.

Yangzhou JYQ y Stuttgart MK. 1999. Characterization of *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* Starch. Starch/Stärke, Vol. 51, Nº 4, 116–120.

Acceptance of bread supplemented with mushrooms mycelia

Lira A.P., Alves M.F., Souza A.O., Oliveira C.P., Carvalho S.A.

Department of Natural and Exacts Sciences, State University of Southwest of Bahia, Academic Module, Hightway BR 415, Km 03, Zip Code 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil. Zip Code: 45700-000. E-mail: scarvalho@uesb.edu.br

RESUMEN

La evaluación sensorial se realizó a través de la aceptación y la intención de compra. Los panes se prepararon utilizando micelios de hongos de cada especie, para reemplazar la harina de trigo en 0, 5, 10, 15 y 20% y en un total de diez muestras. Fueron cuantificados los atributos sabor, textura y apreciación global, utilizando una escala hedónica de nueve puntos con los extremos “me disgusta extremadamente” y “me gusta extremadamente". La intención de compra fue medida usando una escala de siete puntos con extremos “definitivamente no lo compraría” y “definitivamente lo compraría”. Sesenta catadores no entrenados, entre 18 y 41 años (30% hombres, 70% mujeres) participaron en la prueba de consumidores. Los datos fueron analizados mediante regresión lineal univariante, para evaluar el efecto de los niveles de reemplazo de la harina de trigo por micelios de hongo, sobre la aceptación ($p \leq 0.05$). Por lo tanto, hubo un aumento en la aceptación de la textura hasta el nivel de sustitución del 10%, con micelios Eryngii, seguido de una caída en la aceptación para los niveles de reemplazo más altos. El pan con 10% de eryngii mycelia mostró una buena aceptación y podría incorporarse en formulaciones para pan.

Palabras clave: *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, pan, escala hedónica, intención de compra.

ABSTRACT

Sensory evaluation was performed through acceptance and intention to purchase. The breads were prepared using mushroom mycelia of each species in the proportions of 0, 5, 10, 15 and 20% replacing wheat flour, totalizing ten samples. Acceptance attributes of bread, including appearance, flavor, texture, and overall acceptance were measured using a nine-point hedonic scale with extremes ranging from extremely “dislike” and “like”. Accordance to purchase were measured using seven-point scale with extremes ranging from I would definitely: “not buy it” and “buy it”. Sixty untrained consumers from 18 to 41 years old (30% men, 70% women) took part in the consumer test. The dates were analyzed using univariate linear regression to assess the effect of replacement levels of wheat flour by mushroom mycelia on acceptance ($p \leq 0.05$). Thus, there was an increase on texture acceptance up to 10% replacement level of eryngii mycelia, followed by drop in acceptance at higher replacement levels. The bread with 10% eryngii mycelia showed a good acceptance and could be incorporated into bread formulation.

Keywords: *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, bread, hedonic scale, accordance to purchase

INTRODUCTION

Bread is a food widely consumed worldwide and part of the culture in several countries. With a wide variety of types, flavors, shapes and sizes, it has gained more and more popularity among consumers, attracting the interest of producers in the enrichment and provision of innovative products with nutritional appeal.

The World Health Organization (WHO) recommends an annual consumption of 60 kg of bread. In Brazil, however, only 33.5 kg per year, per inhabitant, are consumed – 86% of which correspond to artisan breads (ABIP, 2009). The bakery industry is increasingly investing in the offer of a variety of innovative items, due to the constant consumers’ pursuit of food that is both tasty and contributes to a more balanced and healthy diet. Such offer involves breads enriched with natural ingredients, such as flours, oats, cereals, tubers, spices,

among others (ABIMAPI, 2015).

In this sense, edible mushrooms are part of the functional food group, for presenting important biological properties for the regulatory metabolism. They have great nutritional value because of their low energy density (315 Kcal/100 g), high fiber content (18.01%), proteins (17.14%), and low lipids content (1.23%) (Balbi et al., 2013). Moreover, they present excellent macro- and microelements content, and have essential amino acids, polyunsaturated fatty acids, among other components.

Of the more than 10 thousand species of mushrooms in existence, about two thousands are considered as edible, and only 20 of them are grown commercially. In Brazil, the most cultivated and sold species are: *Agaricus bisporus* (common mushroom), *Pleurotus spp*. (oyster mushrooms), *Lentinula edodes* (shiitake), and *Agaricus blazei* (almond mushroom) (ANPC, 2015).

The shitake ranks second in world production, and its largest crops are found in China, Japan and other Asian countries. In 2000, China produced more than 80% of the world production. It has been valued for its nutritional and also health benefits, acting in cholesterol levels reduction, with antitumor and antiviral properties (Chang & Miles, 2004).

The aqueous extract of the shitake mushroom has inhibitory activity against human tumor cells proliferation on the larynx and cervix (Finimundy et al., 2013). Another study showed antimicrobial action against 84.6% of the microorganisms tested (Hearst et al., 2009). The Lentin, protein present in this mushroom, has antifungal and inhibiting action against HIV-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells (Ngai & Ng, 2003).

The *Pleurotus eryngii*, known as king oyster mushroom or simply eryngii, is one of the most popular and new species of edible mushrooms, successfully accepted among consumers in North Africa, Europe and Asia, because of its taste and high nutritional value (Jeong et al., 2010). The *Pleurotus* genus occupies the third position among the most cultivated mushrooms. They are considered as widely adaptable, because they have enzymes that degrade polysaccharides such as lignin, cellulose and hemicellulose, enabling them to grow in a variety of substrates. They have very characteristic flavor and odor and can be grown in different climatic conditions (Chang & Miles, 2004).

Studies show that eryngii is a potential food for functional and therapeutic use, because it has antitumor, anti-inflammatory and antioxidant activities and prevents cancer (Lin et al.; Zhang et al.; Ma et al., 2014).

Alam et al. (2011) conducted an experiment to investigate the biochemical and histological changes in rats with hypercholesterolemia, which were fed *P. eryngii* (king oyster mushroom), noting that the feed with 5% powder of this mushroom was able to reduce cholesterol, triglycerides and total lipids.

Unlike bread, edible mushrooms are not highly consumed and have low popularity due to some beliefs, because many people regard mushrooms as being hallucinogenic, toxic and costly, being restricted for consumption by people of the most favored social classes.

In view of the expounded and the large number of studies with edible mushrooms showing their high nutritional value and nutraceutical properties, this study aimed to evaluate the impact of adding mushroom flour on the sensory acceptance of bread.

MATERIALS AND METHODS

Samples

For this study two species of edible mushrooms were acquired: shitake (*L. edodes*) and eryngii (*P. eryngii*). The eryngii was obtained fresh from a manufacturing industry of edible mushrooms located in Vitória da Conquista, Southwestern from Bahia, Brazil. The shitake was obtained dried in a market located in Porto Seguro, South from Bahia, Brazil. Samples were frozen and stored in plastic bags to food, separately.

Flour production

The eryngii mushrooms were dried in an air ventilated oven (SOLAB, model SL-102, São Paulo, Brazil) at a 60°C for 24 hours. Then, the two species of edible mushrooms were grinded used a knife mill and sieved at 40 mesh. Flours were stored in plastic bags to food and kept under refrigeration until the production of homemade breads.

Homemade breads production

The homemade breads were produced replacing wheat flour in the proportions of 0%, 5%, 10%, 15% and 20% by shitake and eryngii flours. The others ingredients used are: milk UHT, soya oil, vegetable fat, sugar, salt and dry yeast.

The first step was to mix dry ingredients: wheat flour, edible mushrooms flour, sugar and salt. After homogenization the following wet ingredients were added: milk UHT, soya oil, vegetable fat, egg and dry yeast. Dough was prepared by mixing all ingredients (dry and wet) until complete homogenization. Then, the doughs were placed in tin pan (metal forms), maintained static for 35 minutes and baked at 180ºC/25 minutes. After baking, the finished product in tin pan was taken out of the oven, cooled to room temperature for 1 h and packed in polyethylene bags.

Microbiological quality

The microbiological quality of edible mushrooms flour and all formulations of homemade breads were submitted to analysis of total coliforms at 45ºC, *Bacillus cereus* and *Salmonella sp.* Before sensory analysis total coliforms determination was performed in order to achieve good manufacturing practices (SILVA et al., 2010).

Sensory analysis

Sensory analysis was performed in the Laboratório de Análise Sensorial (LABAS), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Itapetinga, Bahia, Brazil). A total of one hundred untrained panelists participated in the acceptance analysis, males and females, older than 18 years, between students, staff and professors in the UESB, no relationship of subordination to the researchers.

The acceptance of homemade breads with mushrooms flours was separated in two blocks, performed in two consecutive days. The block one (1) was referring to acceptance analysis of samples of homemade breads with mushroom eryngii (hBread.Er) and block two (2) of homemade breads with mushroom shitake (hBread.Sh).

Acceptance attributes of homemade breads, including appearance, flavor, texture, and overall acceptance were measured using a nine-point hedonic scale with 1, 5 and 9 representing “extremely dislike”, “indifferent” and “extremely like”, respectively. Accordance to Purchase were measured using seven-point scale with 1, 4 and 7 representing “I would definitely not buy it”, “indifferent” and “I would definitely buy it”, respectively.

The samples were showed in monadic form, on napkins coded with three-digit random numbers, with glass of water and one cracker for cleaning the gustatory cells, and an record card (**Figure 1**). Each untrained panelist evaluated all the samples in the same block (hBread.Er or hBread.Sh) and was asked to wait the evaluation between the samples.

Avaliação Sensorial

Nome: _____

Data: ____/____/____ Sexo: M( ) F( ) Idade: _____

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____

Por favor, prove a amostra de pão e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou do produto. Avalie quanto à aparência, textura, sabor e impressão global.

9 – Gostei extremamente
8 – Gostei muito
7 – Gostei moderadamente
6 – Gostei ligeiramente
5 – Indiferente
4 – Desgostei ligeiramente
3 – Desgostei moderadamente
2 – Desgostei muito
1 – Desgostei extremamente

( ) **Aparência**
( ) **Sabor**
( ) **Textura**
( ) **Impressão Global**

Por favor, indique na escala abaixo, se você compraria ou não compraria este produto.

( ) Certamente eu compraria
( ) Provavelmente eu compraria
( ) Talvez eu compraria
( ) Indiferente
( ) Talvez eu não compraria
( ) Provavelmente eu não compraria
( ) Certamente eu não compraria

Figure 1. Record card used in the sensory analysis of the acceptance test and purchase intent of bread with mushroom mycelia by each untrained panelist.

Experimental Design and Statistical Analysis

The experimental design was randomized complete block with the sources of variation levels of substitution of mushroom flour (treatment) and panelists (blocks and repetition). The analyses were performed in two separated blocks each representing mushroom flour (shitake and eryngii). The scores were submitted to univariate regression analysis at 5% of probability and was used the S.A.S. program version 9.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological quality of mushrooms flours and homemade breads

In accordance with current legislation in Brazil (Brasil, 2001) the mushrooms flours (eryngii and shitake) and homemade breads produced did not show risk to consumer's health, because the bacterial account was within acceptable limits.

To total coliforms at 45ºC was performed the counting of most probable number per grams (MPN/g) and were obtained values lower than 3,0 MPN/g for all the samples. To *Bacillus cereus* was performed the number of colony-forming units per gram (CFU) and were obtained values lower than $1{,}0 \times 10^2$ CFU for all the samples. To *Salmonella* sp were obtained absent of colony. The values reference according Brasil (2001) are 10^2 MPN/g, $3{,}0 \times 10^2$ CFU and absent to total coliforms, *Bacillus cereus* and *Salmonella* sp, respectivily.

Sensory Analysis

The profile of untrained panelists showed greater participation of women in aged between 18 and 24 years old, with 74.6% of women in the group of evaluation of homemade bread with eryngui flour and 78.8% of people in the age group from 18 to 24 years evaluating homemade bread with shitake. The complete distribution between gender and age group in the two different blocks of analysis are show in **Figure 2**.

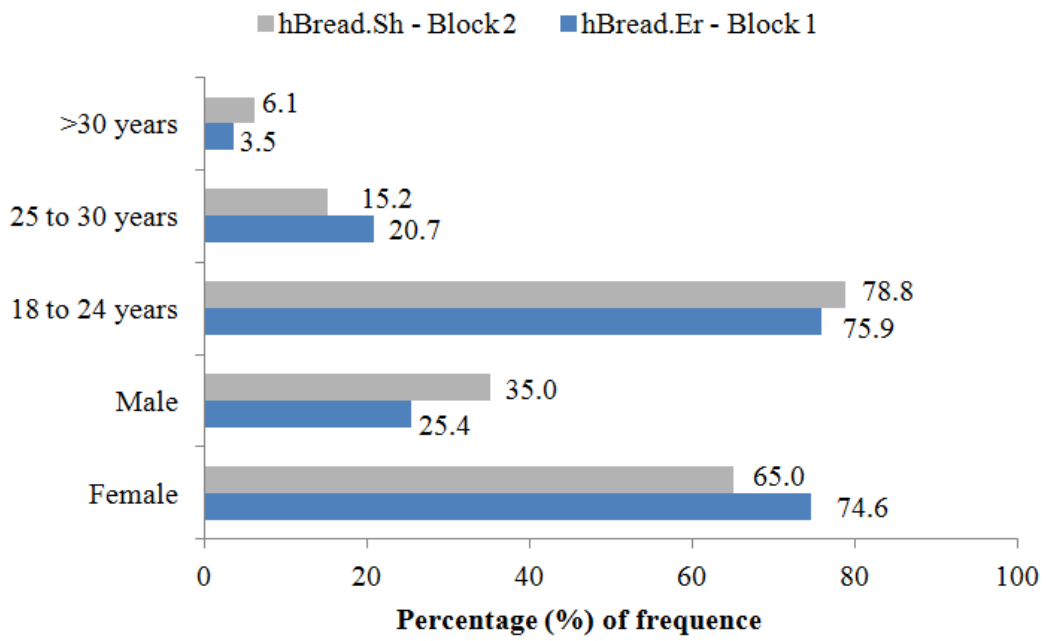


Figure 2. Profile of untrained panelists that participated of the acceptance analysis of homemade bread with mushrooms mycelia.
Legend: h.Bread.Er – homemade breads with eryngii flour; h.Bread.Sh – homemade breads with shitake flour

They were obtained means scores for acceptance to attributes appearance, flavor, texture and overall acceptance. A spider graphics were constructed for each block, showed in **Figure 3**, and represents the acceptance profile. The homemade bread without mushroom mycelia (0%) presented the better acceptance scores to appearance, texture and overall acceptance than others samples in the block 2 (h.Bread.Sh), following average values: 7.8 ± 1.5, 7.7 ± 1.5, and 7.6 ± 1.3, respectively. To flavor attribute the acceptance scores was closely between the samples h.Bread without mycelia (7.4 ± 1.4) and h.Bread.Sh 10% (7.3 ± 2.0). These degrees of liking are located between "moderately like" and "very much like".
In the block 1 (h.Bread.Er) the sample of homemade bread with 10% of eryngii flour showed the better acceptance scores to appearance, flavor,texture and overall acceptance than others samples in this block , following average values: 7.4 ± 1.2, 7.6 ± 1.2, 7.5 ± 1.3 and 7.4 ± 1.1, respectively. These liking scores are located between "moderately like" and "very much like".

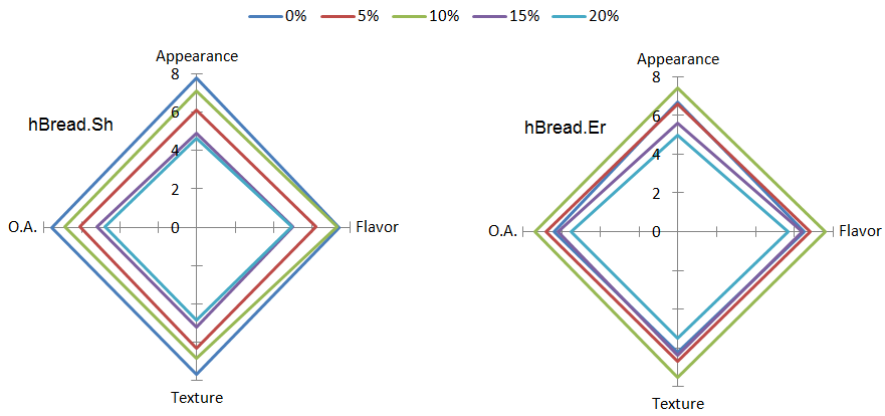


Figure 3. Profile of homemade bread supplemented with mushrooms mycelia in four replacement levels for appearance, flavor, texture and overall acceptances.
Legend: h.Bread.Er – homemade breads with eryngii flour; h.Bread.Sh – homemade breads with shitake flour

The formulations with 20% of replacement by mushroom flours were the least accepted, with lower means scores to homemade breads with shiitake flour as compared to homemade breads with eryngii flour. The liking scores to h.Bread.Sh 20% are located between "slightly dislike" and "indifferent", already the h.Bread.Er 20% are located between "indifferent" and "slightly like". This shows a lower rejection of homemade breads with eryngii flour.
These results demonstrate that is possible to apply up to 10% eryngii flour in homemade bread formulation and to maintain a positive evaluation for the acceptance attributes, for this group of consumers. In Brazil the consumption of mushrooms is restricted to a small class of consumers due to the price and the little market availability. However, edible mushrooms have high nutritional value and medicinal potential against many diseases. Thus, a good sensorial evaluation extends the possibilities of applying edible mushroom in food formulations aiming to increase the nutritional and medicinal quality. Univariate regression analyses were performed with the acceptance scores to evaluate significance between dependent variables (acceptance attributes and Accordance to purchase) and independent variables (degree of replacement). The homemade breads with shiitake flour presented significance to texture attribute ($p < 0,05$), with adjusted linear model to the acceptance scores for this attribute (**Table 1**). The increase of shitake flour contributes negatively to the texture acceptance of these homemade breads.

Table 1. Adjusted model that represents the variation of texture acceptance ($\hat{Y}$) of homemade brade formulated with different levels of shiitake flour, significance level and determination coeficient

Attribute	Model	Probability	R^2
Texture	$\hat{Y} = 7,52 – 13,50x$	<0,0001	0,847

x: concentration of shitake flour (%).

For the other acceptance attributes analyzed there wasn't model adjusted to represent the variation of shiitake flour and the acceptance scores in homemade breads, although there is a tendency of decrease in acceptance when percentage of substitution is increased, according to the profiles presented in **Figure 3** (h.Bread.Sh). The external lines represent a greater degree of acceptance.
The homemade breads with eryngii flour showed significant relationships to acceptance of texture attribute and Accordance to Purchase ($p < 0,05$) with replacement levels of eryngii flour, with adjusted quadratic model to the acceptance scores for attribute and Accordance to Purchase (**Table 2**). The increase of eryngui flour contributes positively until 10% of replacement, with decreasing from that point.

Table 2. Adjusted models that represents the variation of texture acceptance ($\hat{Y}$) and Acoordance to Purchase of homemade brade formulated with different levels of eryngui flour, significance level and determination coeficient

Attribute	Model	Probability	R^2
Texture	$\hat{Y} = -134,43x^2 + 24,033x + 6,0951$	< 0,0001	0,877
Accordance to Purchase	$\hat{Y} = -107,73x^2 + 17,415x + 4,7597$	0,0003	0,928

The acceptance scores obtained for the appearance, flavor and overall acceptance attributes weren't adjusted model to represent the variation of erynguii flour and the acceptance scores in these homemade breads, although the trend approached the adjusted model, with an increase of acceptance up to 10% of substitution

with subsequent decrease, according to the profiles presented in **Figure 3** (h.Bread.Er). The external lines represent a greater degree of acceptance (h.Bread.Er10% followed by h.Bread.Er5% and h.Bread.Er0%).
When evaluating the average scores for Accordance to purchase was observed that each block formed by different group of untrained panelists pointed out different samples as the one of greater intention to buy. The means score and standard deviation are showed in **Figure 4**. The bread without mushroom mycelia had the higher score for Accordance to purchase (6.05 ± 1.24) to block 2 and homemade bread with 10% of eryngii mycelia had the higher score (5.66 ± 1.40) to block 1. These samples were among the terms "I would definitely buy it" and "Maybe I would buy it".

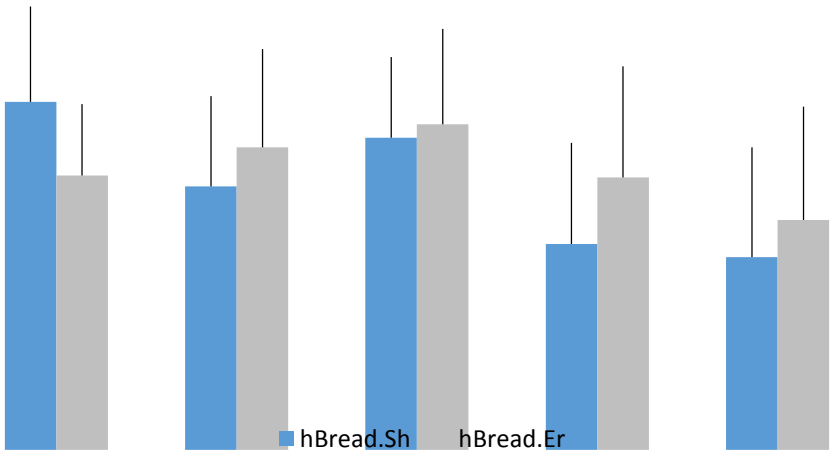


Figure 4. Means score to Accordance to purchase of homemade breads evaluated.

CONCLUSIONS

Homemade breads made with eryngii had higher means scores to acceptance of the attributes in relation to homemade bread made with shitake.
In view of the results obtained in this study, it is believed that obtaining a homemade bread formulation with replacement of 10% of wheat flour by eryngii flour can become an alternative for consumption of edible mushrooms among populations with less purchasing capacity.

REFERENCES

Alam, N. et al. Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. Saudi Journal of Biological Sciences (2011) 18, 403–40.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA – ABIP (2009). Encarte Técnico: "A importância do Pão do Dia (Tipo Francês) para o segmento da Panificação no Brasil". Disponível em: <http://www.abip.org.br/imagens/file/encarte6.pdf> Acesso em: 22 de janeiro de 2016.

Associação Brasileira Das Indústrias De Biscoitos, Massas Alimentícias E Pães & Bolos Industrializados – Abimapi (2015). Anuário ABIMAPI 2015. Disponível em: < http://www.abimapi.com.br/cloud/ABIMAPI_ANUARIO_2015.pdf> Acesso em: 23 de janeiro de 2016.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COGUMELO (ANPC). Cogumelos no Brasil. Disponível em: <http://www.anpc.org.br/index.php/cogumelos/cogumelos-no-brasil>. Acesso em: 02 de julho de 2015.

Balbi, M. et al. Análise nutricional e perfil aminoacídico de cogumelos shiitake (*Lentinus edodes*, Agaricaceae). Visão Acadêmica, Curitiba, v.14, n.4, Out. - Dez./2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – CNNPA nº 12, de 1978. Aprova as "Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos (e Bebidas)". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 jul. 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Aprova o "Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos". Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

Chang, S. T.; Miles, P. G. Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 2004.

Chang, S. T. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. In China. International Journal of Medicinal Mushrooms, v.1, p. 291-300. 1999.

Finimundy, T. C. et al. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. Nutrition Research 33 (2013) 76–84.

Hearst, R. et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. Complementary Therapies in Clinical Practice 15 (2009) 5–7.

Jeong, Y. T. et al. Antitumor andimmunomodulating activities of endo-biopolymers obtained from a submerged culture of *Pleurotus eryngii*. Food Science and Biotechnology, 19 (2010), 399–404.

Lin, J-T. et al. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. LWT - Food Science and Technology 55 (2014) 374-382.

Ma, G. et al. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. Carbohydrate Polymers 114 (2014) 297–305.

Ngai, P. H. K.; NG, T. B. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. Life Sciences 73 (2003) 3363–3374.

Silva, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

Stamets, P.; Chilton, J. S. The mushroom cultivator a pratical guide to growing mushurrons at home. Washington: Agarikon Press, 1983, 415p.

Zhang, A. et al. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from Pleurotus eryngii using response surface methodology. International Journal of Biological Macromolecules 65 (2014) 28–32.

ACKNOWLEDGE

We gratefully thank the CAPES by granting the scholarship, the Hochibra exotic mushrooms by donation of eryngii mushrooms and the panelists who participated in the sensorial acceptance analysis.

Perfil de textura sensorial de papas andinas (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*)

López EP [1, 2], Goldner MC [2, 3], Sammán NC [4]

(1) CONICET, Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.
(2) Instituto de Investigación Sensorial de Alimentos, Universidad Nacional de Salta, Argentina.
(3) NIQUI-CONICET, Universidad Nacional de Salta, Argentina.
(4) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.
e-mail: estelapatricialopez@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar el perfil de textura sensorial de seis variedades de tubérculos andinos (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena* v. Chacarera, Chorcoyeña, Collareja redonda, Ojos colorados, Runa y Overa) y papa común (*Solanum tuberosum* v. Spunta). Se entrenaron siete jueces pertenecientes al Instituto de Investigación Sensorial de Alimentos. Se analizaron once atributos texturales en las papas hervidas: adhesividad manual, friabilidad, adhesividad a los labios, humedad, aspereza, dureza, cohesividad, adhesividad al paladar, deformabilidad, adherencia a los dientes y humedad absorbida. Se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm, ancladas en sus extremos. Para analizar puntos extremos se utilizaron diagramas de Tallo y Hojas y de Cajas y Bigotes, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) según un modelo mixto, donde las repeticiones (duplicado) y las muestras se tomaron como factores fijos, y los asesores como factores aleatorios, analizando la significación de las interacciones muestra*asesor, repetición*asesor y muestra*repetición. Para establecer diferencias significativas (p<0,05) entre las muestras para cada atributo textural se utilizó la prueba de Tukey. Respecto a asesor*repetición, se observó que seis de los once atributos presentaron interacción significativa (p<0,05), mientras que muestra*asesor, y muestra*repetición resultaron significativas sólo para cuatro y tres atributos respectivamente. Se observó que los descriptores texturales más dificultosos de evaluar fueron adhesividad manual, friabilidad, humedad y humedad absorbida. Se observó que las papas Chorcoyeña y Runa resultaron la más duras y cohesivas, y por lo tanto la menos friables y deformables. La papa Collareja fue poco adhesiva a los labios y la menos áspera. La Chacarera fue una de las de mayor adhesividad a los dientes y la de mayor aspereza. La denominada Ojos colorados, se destacó por su alta adhesividad a los labios. La papa Overa, resultó la de mayor adhesividad manual y una de las más adhesivas a los dientes, ya que resultó una de las menos duras, cohesivas y ásperas, y más friable y deformable; aún así fue poco adhesiva a los labios. La muestra control, resultó la más friable y deformable, y una de las menos duras y cohesivas. En conclusión, las variedades andinas, a excepción de la Overa, resultaron de textura más dura y cohesiva, menos friables y deformables que la papa blanca comúnmente consumida. Estas características seguramente se relacionan a las propiedades del almidón contenido en cada tubérculo, y confieren a cada papa una amplia gama de aplicaciones gastronómicas y en la industria alimentaria.

Palabras clave: papas andinas, textura, perfil sensorial.

ABSTRACT

The objective was to study the sensory texture profile of six varieties of Andean tubers (Solanum tuberosum ssp. Andigena v. Chacarera, Chorcoyeña, collareja round, Red eyes, Runa, and Overa) and common potato (Solanum tuberosum v. Spunta). Seven judges were trained. Eleven textural attributes were analyzed in the boiled potatoes: Manual adhesiveness, friability, adhesiveness to the lips, moisture, roughness, hardness, cohesiveness, adhesiveness to the palate, deformability, adhesion to teeth and absorbed moisture. Unstructured 10 cm scales, anchored at its ends were used. To analyze endpoints, stem and leaves and box and whisker diagrams were used, an analysis of variance (ANOVA) was performed according to a mixed model where the repeats (duplicate) and samples were taken as fixed factors, and assessors as random

factors, analyzing the significance of sample*assessor, repeats*assessor y sample*repeats interactions. The Tukey test was used to establish significant differences ($p<0.05$) between samples for each textural attribute. Regarding assessor*repetition, it was noted that six of the eleven attributes showed significant interaction ($p<0.05$), while the interactions sample*assessor, and sample*repeat, were significant only for four and three attributes respectively. It was observed that the most difficult textural descriptors to be evaluated were manually adhesiveness, friability, moisture and absorbed moisture. It was observed that the potatoes Runa and Chorcoyeña were the more hard and cohesive, and therefore, the less friable and deformable sample. The Collareja potato was the less adhesive to lips and less hard sample. The Chacarera was one of the most adhesiveness to the teeth and greater ruggedness potato. The so-called Red eyes potato was noted for its high adhesiveness to the lips. The Overa was the sample with higher manual adhesiveness and one of the most adhesive to the teeth: it was one of the least hard, cohesive and rough sample, and more friable and deformable; but nevertheless, it was still slightly sticky to lips. The control sample was the most friable and deformable, and one of the least hard and cohesive sample. In conclusion, the texture of boiled Andean varieties, except for the Overa, resulted more hard and cohesive, and less friable and deformable than white potatoes commonly consumed. These characteristics probably were related to the properties of each tuber starch, and give to every potato a wide range of applications in the food industry.

Keywords: Andean potatoes, texture, sensory profile.

INTRODUCCIÓN

Las papas, en sus múltiples variedades, son un alimento básico para muchos grupos poblacionales a lo largo del mundo, al punto de ser el cuarto producto en importancia alimenticia después del maíz, trigo y arroz (Loyola et al. 2010). También lo fueron para las poblaciones andinas, ya que constituyeron un verdadero baluarte de la puna. Aunque actualmente se conocen más de 200 variedades de papas andinas, sólo unas pocas se continúan cultivando, lo que pone en peligro la biodiversidad de la región (Jiménez y Sammán 2014). Sin embargo, existe en la actualidad un creciente interés y revalorización por el consumo de productos alimenticios cuyos principales atractivos se vinculan con su origen geográfico y cultural, surgiendo así el concepto de *consumo turístico* de productos tradicionales, artesanales y las preparaciones típicas de un lugar (Arzeno y Troncoso 2012). En el caso de las papas y otros tubérculos andinos, se ha producido en los últimos años un doble interés: por un lado, se las considera alimentos tradicionales del norte argentino, a su vez, son altamente valoradas como productos "gourmet". Esta atracción por las papas andinas desde distintas partes del mundo, se debe principalmente a sus distintivos colores y texturas. Por ello, en este trabajo se planteó estudiar sensorialmente uno de dichos aspectos: la textura. El objetivo de la presente investigación fue estudiar el perfil de textura sensorial de seis variedades de tubérculos andinos (*Solanum tuberosum* ssp. andigena v. Chacarera, Chorcoyeña, Collareja redonda, Ojos colorados, Runa y Overa), tomando como referencia una papa común (*Solanum tuberosum* Spunta).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las variedades de papas andinas estudiadas fueron: Chacarera, Chorcoyeña, Collareja redonda, Ojos colorados, Runa y Overa (**Figura 1**). Las mismas fueron obtenidas por donación de la Cooperativa CAUQueVa (Tumbaya, Jujuy, Argentina). Como referencia, se trabajó con papa de variedad Spunta adquirida en el mercado local.

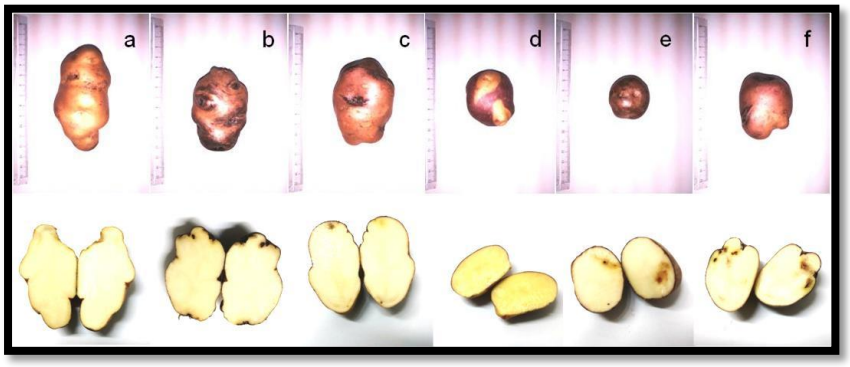


Figura 1. Variedades de papas andinas estudiadas
a: Collareja;
b: Chacarera;

c: Chorcoyeña;
d: Overa;
e: Ojos Colorados;
f: Runa

Tanto para el entrenamiento como para la valoración sensorial, las papas se presentaron limpias, peladas, cortadas en cubos de tamaño homogéneo, hervidos durante 13 minutos.

Entrenamiento de los jueces – parámetros texturales

Para la determinación de los parámetros texturales, se llevó a cabo un entrenamiento a siete panelistas con experiencia en evaluación sensorial de alimentos. De los 7 panelistas, seis fueron de sexo femenino; los participantes presentaron un rango etario de 30 a 45 años, todos ellos pertenecientes al Instituto de Investigación Sensorial de Alimentos (IISA).

El periodo de entrenamiento se extendió por cuatro semanas, dado que se necesitaba reconocer la textura del producto papa, conocer la terminología o definición de cada atributo textural, adecuar el manejo de escalas, e identificar los atributos sensoriales con el mínimo error entre las repeticiones realizadas por cada juez.

Tanto en el entrenamiento como en las valoraciones definitivas, se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm, ancladas en sus extremos (menos a más).

Los once atributos sensoriales evaluados, las correspondientes definiciones y las anclas utilizadas, se muestran a continuación en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Definición de los atributos texturales valorados en papas andinas

ATRIBUTO TEXTURAL	DEFINICIÓN	ANCLAS
Adhesividad Manual	Fuerza necesaria para separar en dos piezas la muestra con la parte convexa de una cuchara.	Menos = malvavisco Más = manteca
Friabilidad	Grado en que la muestra se rompe en trozos más pequeños. Masticar 3 veces con los molares. Prestar atención a si hace mucha miga o se disocia en muchas partes pequeñas.	Menos = malvavisco Más = masa quebrada
Adhesividad a los labios	Grado en el que la muestra se adhiere a los labios	Menos = tomate Más = oblea
Humedad	Humedad percibida sobre la superficie del producto cuando esta se pone en contacto con los labios	Menos = galleta de agua Más = tomate
Aspereza	Sensación de abrasión percibida en la lengua. Ver si la muestra raspa la lengua al deslizarse. No morderla.	Menos = gelatina Más = oblea
Dureza	Resistencia que ofrece la muestra al masticarla entre los molares. Fuerza necesaria para dar el 1° mordisco.	Menos= queso crema Más = caramelo duro
Cohesividad	Grado de deformación y/o ruptura experimentada por la muestra luego de ser masticada entre los molares.	Menos= masa quebrada Más = chicle
Adhesividad al paladar	Fuerza necesaria para mover la muestra del paladar. Pegar la muestra al paladar y medir la fuerza necesaria para despegarla con la lengua.	Menos= caramelo de gelatina Más = caramelo de leche

Deformabilidad	Grado en que la muestra pierde su forma inicial. Masticar 3 veces con los molares.	Menos= salchicha Más = yema de huevo hervido
Adhesividad a los dientes	Grado en que el producto se pega en los dientes	Menos= manzana Más = caramelo de leche
Humedad absorbida	Cantidad de saliva absorbida por el alimento luego da haber sido masticado.	Menos= agua Más = merengues secos

Valoración sensorial de los atributos texturales en papas andinas

Luego del entrenamiento, se procedió a la evaluación de las seis variedades de tubérculos andinos y de la muestra tomada como patrón. Las muestras se presentaron hervidas sin sal y cortadas en cubos de tamaño homogéneo y enfriadas a temperatura ambiente.

Los jueces valoraron cada muestra por duplicado, según los parámetros texturales. Se requirieron cuatro sesiones para completar la evaluación.

Análisis estadístico

Para analizar los datos referidos al entrenamiento de los jueces, se utilizaron diagramas de Tallo y Hojas y de Cajas y Bigotes a fin de observar la existencia de puntos extremos (*outlines*). Posteriormente, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) según un modelo mixto, donde las repeticiones (duplicado) y las muestras se tomaron como factores fijos, y los asesores como factores aleatorios, analizando la significación de las interacciones muestra*asesor, repetición*asesor y muestra*repetición.

Luego de evaluar el entrenamiento, se realizó ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras para cada atributo textural, utilizando la prueba de Tukey para detectar las muestras diferentes.

Para el análisis estadístico se trabajó con Microsoft Excel v. 2007 e Infostat v. 2014.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 2** presenta a continuación los resultados del entrenamiento de los jueces, mostrando los valores de p para las interacciones.

Tabla 2. ANOVA del modelo mixto de datos texturales de papas andinas

	n	Asesor (A)	Muestra (M)	Repetición (R)	M*A	R*A	M*R
GL		6	6	2	36	10	12
				Valores de p			
ADH. MANUAL	132	0,390	0,019*	0,122	0,003**	0,004**	0,177
FRIABILIDAD	130	0,642	0,001**	0,246	0,046*	0,009*	0,118
ADH. LABIOS	129	0,066	0,029*	0,630	0,241	0,146	0,039*
HUMEDAD	129	0,124	0,020*	0,022*	0,067	0,002**	0,188
ASPEREZA	125	0,254	0,003**	0,582	0,055	0,056	0,022*
DUREZA	131	0,892	0,000***	0,597	0,068	0,024*	0,286
COHESIVIDAD	129	0,108	0,000***	0,157	0,135	0,038*	0,653
ADH. PALADAR	133	0,061	0,017*	0,420	0,927	0,322	0,691
DEFORMABILIDAD	132	0,872	0,026*	0,368	0,000***	0,086	0,018*
ADH. DIENTES	127	0,031*	0,000***	0,512	0,730	0,128	0,538
HUMEDAD ABSORBIDA	133	0,469	0,069	0,787	0,004**	0,014*	0,252

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; GL: Grados de Libertad. ADH: Adhesividad.

Como puede observarse en la **Tabla 1**, sólo la medición de la adhesividad a los dientes representó una

dificultad para los asesores, dado que en las valoraciones se hallaron diferencias significativas para este parámetro. Es por ello, que a través del análisis exploratorio, se debió descartar valores extremos.
Respecto a las muestras, en la tabla se observa que existen diferencias significativas entre éstas en prácticamente todos los parámetros valorados, exceptuando la humedad absorbida. El análisis pormenorizado de las diferencias entre las papas se detallará más adelante en la **Tabla 3**.
En lo referido a las repeticiones, se observó que sólo el parámetro humedad presentó diferencias significativas al ser medido por duplicado.
Al estudiar la interacción muestra*asesor, se advirtieron diferencias altamente significativas ($p<0,001$) para el atributo Deformabilidad, y $p<0,01$ para adhesividad manual y humedad absorbida, mientras que la diferencia fue $p<0,05$ para friabilidad. Esto se interpretó como que estas características texturales resultaron diferentes para las distintas muestras según el asesor.
La interacción Repetición*Asesor, presentó inconvenientes para adhesividad manual, friabilidad, humedad, dureza, cohesividad y humedad absorbida, lo cual se interpreta como que para dichos atributos, se detectaron puntuaciones disímiles en ambas valoraciones (duplicado), según el juez o asesor.
La interacción Muestra*Repetición fue la presentó menores dificultades, dado que se hallaron diferencias significativas sólo para tres parámetros de textura: adhesividad a los labios, aspereza y deformabiliadad, interpretando este resultado como que las muestras presentaron variaciones en las valoraciones, según la repetición.
Como conclusión de éste análisis se obtuvo que el entrenamiento fue adecuado, dado que la mayor parte de los atributos no presentaron valores significativos en las interacciones entre los factores fijos y aleatorios, presentando las principales dificultades para las características de deformabilidad, friabilidad, adhesividad manual y humedad absorbida.
A continuación, la **Tabla 3** presenta los resultados del análisis de comparación de medias para las muestras de papa estudiadas.

Tabla 3. ANOVA para los atributos texturales de las variedades de papas andinas estudiadas

ATRIBUTO TEXTURAL	PAPA						
	Spunta	**Collareja**	**Chacarera**	**Chorcoyeña**	**Overa**	**Ojos Colorados**	**Runa**
ADH. MANUAL	5,41±2,17 ab	4,61±1,28 a	4,86±1,86 ab	3,95±1,71 a	6,67±1,97 b	5,21±1,85 ab	5,16±2,34 ab
FRIABILIDAD	6,10±2,14 c	3,56±1,12 ab	3,97±2,29 ab	2,30±1,03 a	4,41±2,28 bc	3,37±1,96 ab	3,61±2,31 ab
ADH. LABIOS	2,97±2,25 ab	2,69±1,10 a	3,21±1,16 ab	3,17±1,88 ab	2,61±1,33 a	4,51±2,13 b	3,45±1,87 ab
HUMEDAD	4,32±1,55 a	3,89±1,88 a	3,45±1,95 a	3,01±1,33 a	5,09±2,81 a	3,79±2,43 a	4,84±2,60 a
ASPEREZA	3,34±1,63 ab	3,68±1,05 b	4,23±0,93 b	3,95±1,56 b	2,24±1,31 a	3,31±1,47 ab	3,36±1,10 ab
DUREZA	3,94±2,06 a	5,76±1,67 b	6,29±1,35 bc	7,43±1,64 c	3,92±1,79 a	7,21±1,62 bc	7,06±1,39 bc

COHESIVIDAD	1,96±1,02 a	4,24±1,99 bc	3,79±1,18 bc	5,42±2,08 c	2,91±1,24 ab	4,34±2,14 bc	4,70±2,42 c
ADH. PALADAR	4,51±2,56 a	4,69±2,23 a	4,99±1,91 a	3,98±1,99 a	5,23±2,77 a	3,75±2,28 a	3,37±1,72 a
DEFORMAB.	7,03±1,73 c	5,09±1,99 abc	5,63±1,64 abc	4,32±2,19 a	6,31±1,97 bc	4,52±2,58 ab	4,13±2,08 a
ADH. DIENTES	5,74±2,41 ab	6,12±1,16 b	6,61±1,45 b	4,89±2,05 ab	6,24±1,93 b	5,77±1,93 ab	4,08±1,73 a
HUMEDAD ABSORBIDA	4,64±2,04 a	4,99±1,51 ab	5,31±1,76 b	5,46±1,68 b	3,47±1,95 a	4,95±1,75 ab	5,39±1,69 B

Valores medios ± desviación estándar. Letras diferentes en las filas denotan diferencias significativas ($p<0,05$) según prueba de Tukey. ADH.: Adhesividad; Deformab.: Deformabilidad.

En primer lugar se debe notar que las muestras no mostraron diferencias significativas para las características de humedad y la adhesividad al paladar, recordando que para la primera de ellas, se detectaron puntuaciones disímiles en ambas valoraciones (duplicado), según el juez o asesor (**Tabla 2**).
Además, debe notarse que las puntuaciones se distribuyeron a lo largo de la escala planteada, aunque ninguna variedad de papa superó los 8 puntos. Por ello, las anclas utilizadas como referencia (**Tabla 1**) resultaron adecuadas para la valoración sensorial de textura de papas hervidas.
La papa Collareja resultó con baja adhesividad manual, a los labios y al paladar, hallando valores intermedios para cohesividad, dureza, friabilidad y humedad absorbida. Se destacó por ser una de las muestras más ásperas y adhesiva a los dientes. Dadas estas características, esta papa se podría consumir hervida para acompañar carnes, o bien subdividida para formar parte de ensaladas, guisos, cazuelas, etc.
La denominada Chacarera, presentó valores intermedios en prácticamente todos los parámetros de textura, a excepción de la aspereza, ya que resultó la muestra con mayor valor para dicha característica.
La papa Chorcoyeña, resultó con baja adhesividad manual y al paladar, y poca friabilidad, mostrando en consecuencia, baja deformabilidad y alta puntuación para dureza y cohesividad. También obtuvo alta puntuación para humedad absorbida. Dadas estas características, esta papa tendría textura ideal para ser consumida hervida entera o subdividida, o para prepararse al horno o frita.
La muestra llamada Overa, se destacó por ser de características más similares a la papa "común", dado que ambas resultaron significativamente blandas ($p<0,05$) respecto a las demás muestras y, consecuentemente, presentaron bajos valores para friabilidad y cohesividad, adhesivas al paladar y los dientes. La papa común también sobresalió por su alta deformabilidad. Estas características las califican para la elaboración de puré o preparaciones a base de éste.
La papa Ojos Colorados, resultó de textura similar a la Chacarera, a excepción de su alta adhesividad a los labios. Resultó una papa de dureza, cohesividad y deformabilidad intermedias, medianamente friable y adhesiva al paladar y a los dientes.
Por último, la papa denominada Runa se destacó por su alta cohesividad respecto al resto de las muestras, la cual fue significativamente mayor ($p<0,05$). También exhibió valores altos para dureza y humedad absorbida, y por lo tanto, baja adhesividad a los dientes y deformabilidad, adquiriendo así, características similares a las de la papa Chorcoyeña (**Tabla 3**), pudiendo destinarse a los mismos usos culinarios descriptos para Chorcoyeña.
Se debe resaltar que las características de textura de las papas están íntimamente ligadas al contenido y conformación del almidón (papas con mayor proporción de de amilopectina podrían resultar más glutinosas y adhesivas), al contenido de ácido fosfórico (determinante en la viscosidad de la fécula de papa), azúcares

reductores (que influyen negativamente en la fritura) y materia seca (directamente proporcional al contenido de almidón) (Loyola et al. 2010; Gomes y Wong 1998), por lo cual, el presente estudio deberá complementarse en un futuro con dicha información, y así, recomendar con mayor certeza el uso culinario de cada variedad.

CONCLUSIONES

Las variedades andinas, a excepción de la Overa, resultaron de textura más dura y cohesiva, menos friables y deformables que la papa blanca comúnmente consumida. Estas características seguramente se relacionan a las propiedades del almidón, el ácido fosfórico y los azúcares reductores contenidos en cada tubérculo, y confieren a cada papa una amplia gama de aplicaciones culinarias y en la industria alimentaria.

Las características texturales de estas papas las distinguen en los mercados gastronómicos, por lo cual, este trabajo pretende colaborar para revalorizar estos cultivos ancestrales, no sólo como elementos de la cocina gourmet internacional, sino, y aún más importante, como ingredientes de consumo regular en los hogares, como tal, o en múltiples opciones de preparaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Arzeno M, Troncoso C. 2012. Alimentos tradicionales andinos, turismo y lugar: definiendo la nueva geografía de la Quebrada de Humahuaca (Argentina). Revista de Geografía Norte Grande., 52: 71-90.

Gomes R, Wong, D. 1998. Procesamiento de la papa. Revista Agroecológica Indoagro,1(5): 4-7

Jiménez ME, Sammán N. 2014. Chemical characterization and quantification of fructooligosaccharides, phenolic compounds and antiradical activity of Andean roots and tubers grown in Northwest of Argentina. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 64(2): 131-138

Loyola N, Oyarce E, Acuña C. 2010. Evaluación del contenido de almidón en papas (*Solanum tuberosum* cv. Desirée), producidas en forma orgánica y convencional, en la provincia de Curicó, Región del Maule. Idesia (Arica), 28(2), 41-52.

AGRADECIMIENTOS

Loa autores desean hacer llegar su agradecimiento a las personas que conformaron el panel de jueces de este trabajo de investigación, por su desinteresado aporte, habiendo dedicado gran parte de su tiempo a ser entrenados y a medir los parámetros solicitados.

Relevamiento de principios bioactivos de especies leñosas nativas de Catamarca (Departamento Capital)

Lorenzo M.E [1], Gómez P.E.[1], Baroni, M.V.[2], Segovia, A.F[1]

(1) Facultad de Ciencias Agrarias, UNCa, Maestro Quiroga 50, Catamarca, Argentina
ma.emilia.lor@gmail.com
(2) ISIDSA, Secretaría de Ciencia y Tecnología, UNC, Juan Filloy s/n, Ciudad Universitaria, Córdoba.

RESUMEN

En la actualidad existe gran interés en profundizar en la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales. Son escasos los estudios dirigidos al aprovechamiento de ingredientes activos en especies leñosas del Chaco Árido. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el contenido de polifenoles totales (PFT) y ortodifenoles (ODF) en hojas de especies leñosas nativas del Chaco Árido en Catamarca, a fin de seleccionar las más promisorias como fuentes de antioxidantes naturales. Las especies estudiadas fueron *Aspidoserma quebracho-blanco* (quebracho blanco); *Zizyphus mistol* Griseb (mistol); *Geoffroea decorticans* (chañar); *Prosopis nigra* (algarrobo negro) y *Larrea cunefolia* (jarilla). Se prepararon extractos orgánicos y acuosos en los que se determinó la concentración PFT por el método de Folin–Ciocalteau y el contenido de ODF con molibdato de sodio al 5% en etanol al 50%, expresando los resultados en mg de ácido cafeico/kg de muestra seca. El análisis estadístico (ANOVA) mostró que la concentración de PFT para todos los extractos en orden descendente fue: *L. cuneifolia> Z. mistol> G. decorticans> P. nigra> A. quebracho blanco.* La especie vegetal más promisoria como fuente de antioxidantes naturales es *L. cuneifolia* seguida por *Z. mistol* y los mejores resultados en PFT y ODF se obtuvieron en extractos etanólicos.

Palabras claves: antioxidantes, polifenoles, especies leñosas nativas.

ABSTRACT

Currently, there is a great interest in going deep into the search for new sources of natural antioxidants. There are few studies aiming to take advantage of active ingredients of woody species from the arid Chaco. The aim of this work was to study the total polyphenol content (PFT) and orthodiphenols (ODF) in leaves of native woody species in Chaco Arido Catamarca, in order to collect the most promising ones as sources of natural antioxidants. The species studied were *Aspidoserma quebracho-blanco* (white quebracho); *Zizyphus mistol* Griseb (mistol); *Geoffroea decorticans* (chañar); *Prosopis nigra* (black carob) and *Larrea cuneifolia* (creosote bush). Organic and aqueous extracts were prepared in which PFT concentration was determined by the Folin-Ciocalteau method and the content of ODF with sodium molybdate 5% in 50% ethanol, expressing the results as mg caffeic acid / kg dry matter. Among all extraction solvents systems evaluated, ethanol 50% was the one with highest yield. Statistical analysis (ANOVA) showed that the concentration of PFT for all extracts in descending order was: *L. cuneifolia> Z. mistol> G. decorticans> P. nigra> A. quebracho blanco.* According to these results, the most promising plant species as a source of natural antioxidants is *L. cuneifolia* followed by *Z. mistol* and the best results of PFT and ODF were obtained in the ethanol extracts.

Keywords: antioxidants, polyphenols, native woody species.

INTRODUCIÓN

La dieta juega un papel importante en la prevención de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través de la ingestión de compuestos bioactivos de origen vegetal (Altamajo 2009). Las tendencias mundiales en alimentación, indican un creciente interés de los consumidores hacia la ingesta de alimentos funcionales, es decir aquellos alimentos que, además de proveer nutrientes, contengan

sustancias fisiológicamente activas que cumplan una función beneficiosa en la reducción de ciertas enfermedades (Castañeda et al. 2008). Es por ello que en los últimos años ha crecido el interés por el estudio de la capacidad antioxidante de extractos de plantas medicinales y de alimentos debido a que la producción de radicales libres está fuertemente relacionada a una gran variedad de enfermedades y al proceso de envejecimiento. En este sentido, se ha definido a un antioxidante biológico como "una molécula que, cuando está presente en pequeñas concentraciones en relación a un sustrato oxidable puede prevenir, reducir o retrasar la destrucción oxidativa de biomoléculas" (Halliwell 1995).

Si se produce un desequilibrio entre los pro-oxidantes y los antioxidantes, se llega a un estado de estrés oxidativo que puede provocar una excesiva producción de radicales libre (Altamajo 2009). Los antioxidantes ingeridos en la dieta humana destacan a las vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos que por diversos mecanismos neutralizan a las especies radicalarias (Avello y Suwalsky 2006).

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y por sus propiedades antioxidantes merecen atención (Maureen Hernández y Prieto González 1999). En los polifenoles el grado de actividad antioxidante se correlaciona con el número de grupos hidroxilo (Gimeno Creus 2004). Los ortodifenoles presentan elevada actividad antioxidante (Fernández et al. 2014)

Este marco, lleva a plantear nuevas alternativas en la búsqueda de compuestos antioxidantes, específicamente polifenoles, incluso en aquellas especies vegetales que no son de uso frecuente en la alimentación pero que podrían contribuir a un mayor conocimiento sobre potenciales fuentes de compuestos bioactivos como antioxidantes naturales muy requeridos en la industria de alimentos, que asimismo revaloricen el recurso natural de la flora autóctona, impulsando las economías regionales.

Desde el punto de vista de la fitogeografía, las ecorregiones o regiones ecológicas son grandes áreas, relativamente homogéneas, en las que hay diferentes comunidades naturales, que tienen en común un gran número de especies y condiciones ambientales, siendo evidente en ellas los principales procesos ecológicos que mantienen la biodiversidad y los servicios que los ecosistemas naturales proporcionan a la gente. El término se origina a partir de las regiones fitogeográficas o biogeográficas, y de otros valores que van más allá de los biológicos. Son "el gran paisaje" que modela no sólo las formas en que evoluciona lo viviente, sino también la cultura humana (Brown et al. 2006). El Chaco Árido representa el distrito más xérico de la ecorregión "Chaco seco", y en la provincia de Catamarca, Argentina, se extiende por el Valle Central hasta los piedemontes de las sierras que lo enmarcan, abriéndose hacia el sur y sureste hasta trasponer los límites provinciales (Morláns 1995). Presenta una vegetación clímax que corresponde a un bosque abierto de Aspidosperma quebracho - blanco con un estrato arbustivo continuo y un estrato herbáceo bien desarrollado en ausencia de ganado, dado por gramíneas anuales y perennes y por dicotiledóneas herbáceas (Morlans MC y Guichón BA 1995).

En bibliografía son escasos los estudios dirigidos al aprovechamiento de principios activos de las especies leñosas del Chaco Árido, concretamente al estudio de compuestos con reconocida actividad antioxidante y biológica como los polifenoles, sin embargo recientes estudios (Rosi et al. 2007, Dadé et al. 2009, Albrecht et al. 2010, Palacio et al 2011, Pérez et al. 2014) demuestran el inminente avance sobre esta línea de investigación.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el contenido de polifenoles totales (PFT) y ortodifenoles (ODF) en extractos de hojas de especies leñosas nativas del Chaco Árido en Catamarca, a modo preliminar, a fin de seleccionar las más promisorias como fuentes de antioxidantes naturales y determinar el método extractivo más adecuado para tal fin.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se realizó recolección manual de ramas con hojas de *Aspidosperma quebracho-blanco* (quebracho blanco); *Zizyphus mistol* Griseb (mistol); *Geoffroea decorticans* (chañar); *Prosopis nigra* (algarrobo negro) y *Larrea*

cuneifolia (jarilla) de los cuatro puntos cardinales en cada planta muestreada.
El material se tomó de ejemplares ubicados en el departamento Capital de la provincia de Catamarca. En la **Tabla 1** se indica la fecha de muestreo y la georeferencia de los individuos muestreados.

Tabla 1. Fecha de muestreo y ubicación geográfica de los ejemplares muestreados de *A. quebracho blanco, Z. mistol, P.nigra, P. chilensis, G. decorticans, L. cuneifolia* y *L. divaricata*

Spp.	*Código muestra*	*Fecha de muestreo*	*Lugar de muestreo*	*Georeferencia*
A. quebracho blanco	Q	13/04/2016	Parque A. Quiroga	S 28º27´214´´ - W 65º46´276´´
Z. mistol	M	13/04/2016	Parque A. Quiroga	S 28º27´128´´ - W 65º46´336´´
P. nigra	Pn	13/04/2016	Parque A. Quiroga	S 28º27´116´´ - W 65º46´334´´
G. decorticans	Ch	13/04/2016	UNCA	S 28°27´295´´-W 65°47´003´´
L. cuneifolia	Lc	14/04/2016	CAPE	S 28º27´228´´ - W 65º45´952´´

En el laboratorio las hojas fueron separadas manualmente, lavadas, liofilizadas y procesadas con molinillo eléctrico de acero inoxidable. El material liofilizado y molido se almacenó en frascos plásticos rotulados y se conservó en desecador, protegido de la luz hasta su procesamiento.

Extracción de polifenoles

Se prepararon extractos orgánicos y acuosos. Los extractos orgánicos, se obtuvieron por sonicación, siguiendo la metodología de Pérez et al. (2014) con modificaciones, utilizando como solventes los sistemas: metanol-agua y etanol-agua, en dos concentraciones de solvente (50% y 80%), en tres etapas extractivas con proporción final de 0,1 g muestra seca/5 ml solvente. La secuencia del procedimiento en cada etapa fue: adición de determinado volumen de solvente sobre la muestra sólida, agitación en vortex durante 30 segundos, sonicación durante 15 minutos y centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm, separando las fracciones liquida y sólida. La primera se trasvasó a tubo plástico de 10 ml rotulado y sobre la segunda se agregó nuevo volumen de solvente para continuar en la siguiente etapa extractiva. Las fracciones líquidas de las tres extracciones se juntaron en el mismo tubo obteniéndose aproximadamente 5 ml de extracto final.

Los extractos acuosos se obtuvieron por tratamiento hidrotérmico, siguiendo la metodología de Lama Muñoz (2011) con modificaciones. Se partió de un gramo de muestra liofilizada con 15 ml de ácido acético al 0,5%, en tubos falcon con tapa a rosca que se llevaron a autoclave a 120ºC durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos.

Todos los extractos orgánicos y acuosos se conservaron a -20ºC hasta su utilización.

En la **Tabla 2** se indica la nomenclatura utilizada para denominar a los extractos, utilizando el código de muestra definido en la **Tabla 1**.

Tabla 2. Denominación de extractos orgánicos y acuosos de especies leñosas nativas.

Spp.	*E5 (Etanol 50%)*	*E8 (Etanol 80%)*	*M5 (Metanol 50%)*	*M8 (Metanol 80%)*	*TH (Hidrotérmico)*
Q	QE5	QE8	QM5	QM8	QA
M	ME5	ME8	MM5	MM8	MA
Pn	PnE5	PnE8	PnM5	PnM8	PnA
Ch	ChE5	ChE8	ChM5	ChM8	ChA
Lc	LcE5	LcE8	LcM5	LcM8	LcA

Determinación del contenido de polifenoles

En todos los extractos se determinó la concentración de polifenoles totales (PFT), por el método de Folín-Ciocalteu (Singleton et al. 1999), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm y la concentración de ortodifenoles (ODF), con molibdato de sodio al 5% en etanol al 50%, a 370 nm (Gómez et al. 2009). En ambos casos se utilizó ácido cafeico como estándar y los resultados se expresaron como mg ácido cafeico/kg muestra seca. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis estadísticos de los datos

Se aplicó un ANOVA a los valores obtenidos en las determinaciones analíticas a fin de evaluar la variación entre especies y entre método de extracción. En todos los casos, cuando el ANOVA indicó diferencias significativas ($p < 0,05$), la comparación de los valores medios de a pares se realizó empleando el método de comparaciones múltiples DGC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Polifenoles Totales (PFT)

Los contenidos medios de PFT (g ácido cafeico/kg muestra seca), desviaciones estándar y significancia de las diferencias entre extractos para cada especie y entre especies en cada solvente, se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar de los rendimientos en PFT (g ácido cafeico /kg muestra seca) de extractos orgánicos y acuosos de especies leñosas autóctonas de Catamarca.

	***PFT** (g ácido cafeico /kg muestra seca)*				
	Q	M	Pn	Ch	Lc
E5	35,8 ± 0.3 A / a	135,7 ± 13,3 A / b	38,4± 2,6 A / a	74,9± 4,6 A / a	204,9± 28,8 A / c
E8	28,6 ± 0,4 B / a	99,2 ± 5,2 B / c	31,9 ± 0,7 B / a	68,3 ± 4,5 A / b	166,4 ± 7,1 B / d
M5	19,7 ± 1,9 B / a	94,8 ± 7,5 B / c	29,4± 4,1 B / a	59,9 ± 4,5 B / b	168,6 ± 3,2 B / d
M8	25,698 ± 0,1 B / a	82,02 ± 5,7 B / c	28,2 ± 0,2 B / a	58,2± 0,4 B / b	150,9 ±12,3 B / d
A	24,2 ± 4,6 B / a	65,2 ± 5,2 C / c	25,1 ± 1,1 B / a	38,5 ± 1,9 C / b	79,3 ± 2,7 C / d

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el contenido de PFT por solvente dentro de una misma especie; letras minúsculas distintas señalan diferencias estadísticamente significativas de PFT entre especies para un mismo solvente, ($p=0,05$).

El análisis de varianza del poder extractivo, en los solventes ensayados, por especie demostró que el sistema más eficiente para todos los casos fue el etanol al 50%, con diferencias significativas respecto al etanol 80%, a excepción de *G. decorticans*. El etanol 80%, le sigue en poder de extracción en todas las especies, excepto en *L. cuneifolia*, donde el segundo puesto en orden de rendimiento extractivo lo exhibe el metanol 50% sin diferencias significativas respecto al etanol 80% y metanol 80%. Las diferencias entre los extractos metanólicos, a las dos concentraciones ensayadas, no son significativas en ninguna de las especies. El tratamiento hidrotérmico obtuvo el menor rendimiento extractivo en comparación a los solventes orgánicos en todas las especies en estudio. Por su parte las diferencias entre especies vegetales en los diferentes sistemas solvente-agua, destacaron a *L. cuneifolia* con contenido significativamente superior ($p=0,05$) a *Z. mistol* en todos los casos. Es preciso destacar que el contenido fenólico de los extractos orgánicos de *L. cuneifolia* supera en amplio margen a los valores de PFT obtenidos por Borneo et al. (2007) para infusiones de hojas de *Ligaria cuneifolia*, conocida vulgarmente como Liga, ($1x10^6$ mg ácido gálico /kg muestra seca), especie analizada por sus propiedades medicinales y que en dicho estudio se destacó por su elevado poder

antioxidante entre 41 especies vegetales. Asimismo *Z. mistol* manifestó un porcentaje de PFT significativamente superior a *G. decorticans* para todos los solventes ensayados. *A. quebracho blanco* presentó los valores más bajos de PFT, asemejándose a lo reportado por Borneo et al. (2007) para infusiones de hojas de esta especie vegetal (31,1 g ácido gálico /kg muestra seca). No obstante, pese al menor contenido de compuestos fenólicos, el extracto etanólico QE5 supera a los valores reportados para extractos en etanol 50% de hoja de olivo (Olea europea var. Arbequina), reconocida como fuente de antioxidantes naturales (Gómez *et.al*. 2009).

La concentración de PFT en orden decreciente para todos los extractos fue: *L. cuneifolia* > *Z. mistol* > *G. decorticans* > *P. nigra* > *A. quebracho blanco*.

Ortodifenoles (ODF)

Los contenidos medio de ODF (g ácido cafeico /kg muestra seca), desviaciones estándar y significancia de las diferencias entre extractos para cada especie y entre especies en cada solvente, se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Medias y desviaciones estándar de los rendimientos en ODF (g ácido cafeico /kg muestra seca) de extractos orgánicos y acuosos de especies leñosas autóctonas de Catamarca.

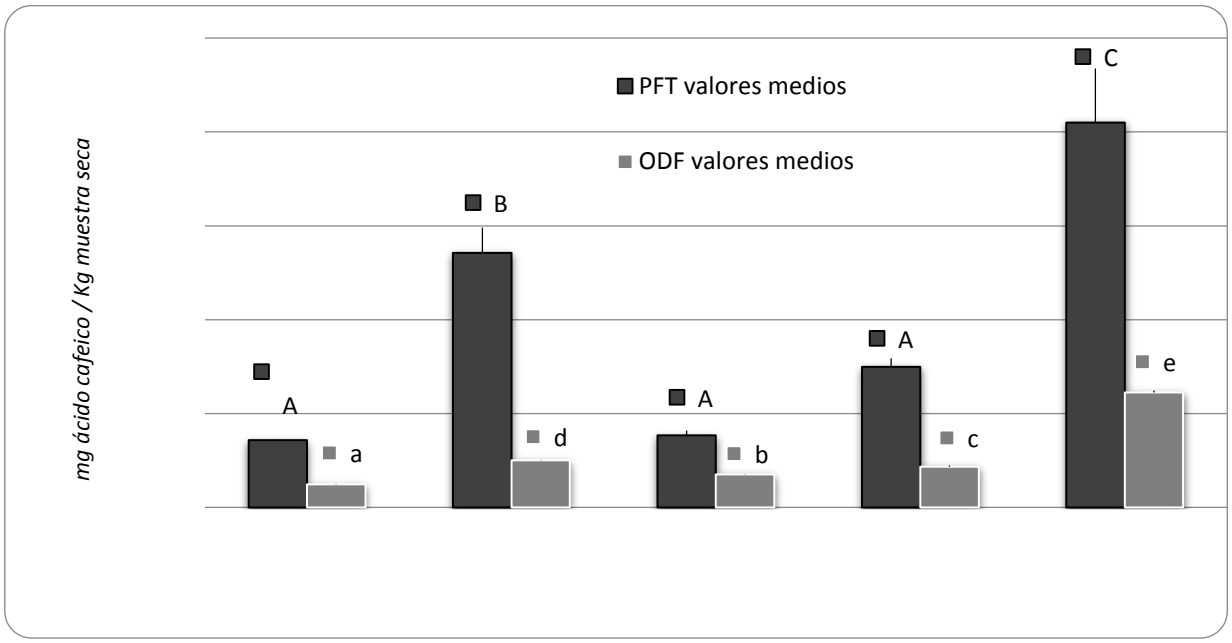
	ODF *(g ácido cafeico /kg muestra seca)*				
	Q	M	Pn	Ch	Lc
E5	12,3 ± 0,3 B / a	25,1 ± 0,1 C / d	17,6± 0,2 B / b	21,7 ± 0,7 C / c	61,2 ± 1,02 D / e
E8	14,3 ± 1,7 B / a	18,3 ± 0,1 B / b	22,2 ± 0,2 C / c	19,5 ± 0,9 B / b	59,4 ± 0,1 D / d
M5	8,3 ± 0,1 A / a	19,7± 0,2 B / c	16,2 ± 1,3 B / b	16,3 ± 0,8 A / b	44,9 ± 1,3 B / d
M8	13,7 ± 0,2 B / a	20,7 ± 0,5 B / b	17,8± 0,6 B / b	19,2 ± 0,2 B / b	54,6 ± 2,1 C / c
A	7,5 ± 0,3 A / a	14,6 ±1,2 A / c	13,4 ± 0,5 A / b	15,2 ± 0,7 A / c	19,1 ± 0,3 A/ d

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el contenido de ODF por solvente dentro de una misma especie; letras minúsculas distintas señalan diferencias estadísticamente significativas de ODF entre especies para un mismo solvente, (p=0,05).

El comportamiento del contenido en ODF difiere en parte a lo descripto para PFT. El etanol al 50% presentó mayor rendimiento en los extractos de *Z. mistol*, *G. decorticans y L. cuneifolia*, mientras que en *A. quebracho blanco* y *P. nigra* el mayor rendimiento se obtuvo con etanol 80%, con diferencia significativa solo en *P. nigra*. En todos los casos el tratamiento acuoso resultó ser el menos extractivo para ODF con diferencias significativas respecto a los solventes orgánicos. Asimismo, *L. cuneifolia* continúa exhibiendo mayor potencial frente al resto de las especies vegetales con diferencias significativas, en todos los tratamientos realizados. En contraposición, *A. quebracho blanco* es la especie que menor contenido en ODF.

En virtud que el solvente etanólico al 50% expresó mayor rendimiento extractivo que el resto de los sistemas ensayados, resulta atractivo analizar las diferencias en contenido fenólico entre las especies vegetales en este sistema solvente-agua. En el **Gráfico 1**, se presentan los valores promedios de la concentración fenólica y ortodifenólica y la significancia entre las diferencias para los extractos etanolicos al 50%, donde se puede visualizar la riqueza fenólica de las especies leñosas nativas, poniendo en evidencia el potencial de *L. cuneifolia* y *Z. mistol* como fuente de antioxidantes naturales bajo un tratamiento extractivo óptimo.

Gráfico 1. Rendimientos en PFT y ODF de los extractos en etanol 50% de especies leñosas autóctonas de Catamarca.



Diferentes letras mayúsculas o minúsculas indican diferencias significativas en contenido de PFT y ODF respectivamente ($p<0,05$) entre los extractos etanólicos las especies vegetales estudiadas.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los contenidos en sustancias antioxidantes (PFT y ODF) de los extractos etanólicos (50% y 80%), metanólicos (50% y 80%) y acuosos preparados a partir de hojas de cinco especies leñosas autóctonas del Chaco Árido en Catamarca: *Aspidosperma quebracho-blanco* (quebracho blanco); *Zizyphus mistol* Griseb (mistol); *Geoffroea decorticans* (chañar); *Prosopis nigra* (algarrobo negro) y *Larrea cuneifolia* (jarilla) podemos concluir:

- Los mejores resultados de PFT y ODF se obtuvieron con los extractos etanólicos, resultando más conveniente el trabajo con el sistema etanol-agua 50% por su mayor rendimiento extractivo para PFT, menor costo e incidencia ambiental y mayor potencialidad de transferencia. En etanol:agua 80%, los extractos de hojas de *Prosopis nigra* y *Geoffroea decorticans*, ocuparon el segundo lugar en contenido en ODF, después de *Larrea cuneifolia*. El tratamiento hidrotérmico resultó ser el menos extractivo para todas las especies vegetales en estudio.
- La especie más promisoria como fuente de antioxidantes naturales es *Larrea cuneifolia* (jarilla) con ventajas significativas respecto al resto de las especies en consideración; seguida por *Zizyphus mistol* (mistol) que es la segunda de las especies analizadas con mayor contenido de polifenoles totales. Por su parte, *Aspidosperma quebracho-blanco* (quebracho blanco); *Geoffroea decorticans* (chañar); *Prosopis nigra* (algarrobo negro), a pesar de presentar un contenido significativamente menor en polifenoles y ortodifenoles que *Larrea cuneifolia* y *Zizyphus mistol*, tienen un contenido superior al de otras especies vegetales consideradas fuentes naturales de antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

Albrecht C, Pellarin G, Rojas MJ, Albesa I, Eraso AJ. 2010. Beneficial effect of *Berberis buxifolia Lam*, *Zizyphus mistol Griseb* and *Prosopis alba* extracts on oxidative stress induced by chloramphenicol.

MEDICINA, 70: 65-70.
Almajano MP. 2009. Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de Goji. Consorci Escola Industrial de Barcelona. Barcelona. España.
Avello M *y Suwalsky M. 2*006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea 494,161-172.
Borneo R, León AE, Aguirre A, Ribotta P y Cantero JJ. 2007. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chemistry112, 664–670.
Brown A, Martínez Ortiz U, Acerbi M y Corcuera J. (Eds.). 2006. La situación ambiental argentina. Fundación Vida Silvestre Argentina, 28-3.
Castañeda CB, Ramos LE, Ibáñez VL. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico, 8: 56-72.
Dadé MM, Fioravanti DE, Schinella GR, Tournier HA. 2009. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (6), 529 – 539.Gimeno Creus E. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Offarm Vol 23, 6: 80-84 disponible en http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508
Fernández Rebaza G A, Quiñones Huayaney ME, Tolentino Chávez JL Chambi Velasquez YM, Ayme Huamaní JM, Bonilla Rivera PE. 2014. Determinación estructural de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de *Geranium ruizii Hieron*. Revista Ciencia & Desarrollo, 18: 7-12.
Gómez E y Salim Rosales C. 2009. Actividad antioxidante de extractos de residuos de poda de olivos –Olea europaea L.- cultivar Arbequina procedentes del Valle Central de Catamarca. Tesis de grado. Universidad Nacional de Catamarca. Catamarca. Argentina.
Disponible en
http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/DIGITESIS/Tesis%20de%20Gomez/index.htm
Lamas Muñoz A. 2011. Obtención y Caracterización de compuestos y fracciones bioactivas a partir de alperujo tratado térmicamente. Estudio de un poderoso antioxidante natural (3,4-hidroxifenilglicol, DHFG): propiedades y purificación industrial. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Sevilla. Sevilla. España. Disponible en http://fondosdigitales.us.es/tesis/tesis/1480/obtencion-y-caracterizacion-de-compuesto-y-fracciones-bioactivas-partir-de-alperujo-tratado-termicamente-estudio-de-un-poderoso-antioxidante-natural-34-dihidroxifenilglicol-dhfg-propiedades-y-purificacion-industrial/
Maureen Hernández A, Prieto González EA.1999. Plantas que contienen polifenoles. antioxidantes dentro del estilo de vida. Centro de Investigaciones Biomédicas. Rev Cubana Invest Biomed,18(1):12-4
Morlans MC. 1995. Regiones Naturales de Catamarca. Provincias Geológicas y Provincias Fitogeográficas. Revista de Ciencia y Técnica, 2: 1-42.
Morlans MC y Guichón BA. 1995. Reconocimiento Ecológico de la Provincia de Catamarca I: Valle de Catamarca. Vegetación y Fisiografía. Revista de Ciencia y Técnica, 1:15-50.
Palacio L, Canteroa JJ, Cusido R, Goleniowskia M. 2011. Phenolic compound production by *Larrea divaricata Cav*. plant cell cultures and effect of precursor feeding. Process Biochemistry, 46:418–422.
Pérez MJ, Cuello AS, Zampini IC, Ordoñez RM, Alberto MR, Quispe C, Schmeda-Hirschmann G, Isla MI. 2014. Polyphenolic compounds and anthocyanin content of Prosopis nigra and Prosopis alba pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. Food Research International, 64: 762–771.
Rossi CA, De León M, González GL, Pereyra AM. 2007. Presencia de metabolitos secundarios en el follaje de diez leñosas de ramoneo en el bosque xerofítico del Chaco Árido Argentino.Tropical and Subtropical Agroecosystems. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal, 7 (002):133-143.
Singleton, VL, Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Methods in Enzymology 299, 152-178,
Vásquez Cardeño A, Cala Molina M, Miranda I, Tafurt García G, Martínez Morales J, Stashenko EE. 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *salvia aratocensis, Salvia*

sochensis, Bidens reptons y Montanoa ovalifolia. Scientia et Technica Año XIII, 33:205-207.

AGRADECIMIENTOS
El presente trabajo se llevó a cabo en el marco del Proyecto "Búsqueda de fuentes de antioxidantes naturales en especies cultivadas y nativas del distrito Chaco Árido (provincia fitogeográfica Chaqueña) en Catamarca" financiado por la SECyT – UNCA.
Agradecemos la colaboración, en la identificación de las especies vegetales consideradas en este estudio, al Ing. Agr. Alejandro Quiroga de la Cátedra de Ecología Agraria y al Ing. Ftal. Efraín Ortiz de la Cátedra de Dasonomía, ambos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Catamarca.

Utilización de un electrodo de ión selectivo para la evaluación de la capacidad ligante de calcio del caseinomacropéptido

Loria, KG [1,4]; Aragón, JC [2]; Pilosof, AMR [4,5] y Farías, ME [3,4,6]

(1) Becaria de Estudio de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.
(2) Becaria CIN 2015 (Consejo Interuniversitario Nacional)
(3) Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7 (6700), Luján, Argentina.
(4) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
(5) ITAPROQ-CONICET. Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
(6) Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).
efarias@mail.unlu.edu.ar

RESUMEN

El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo altamente hidrofílico de 64 aminoácidos, obtenido de la ruptura enzimática específica de la □-caseína por la pepsina o quimosina durante la elaboración del queso. La exploración de la afinidad del CMP por el calcio es muy importante para incrementar la biodisponibilidad del calcio en la población. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP a través de la utilización de un electrodo selectivo de calcio. Los datos obtenidos fueron representados en una gráfica de Klotz para obtener la constante de asociación aparente (K_{ap}) y el máximo calcio unido. Se concluye que en condiciones de bajo calcio libre (sitio de alta afinidad) un mol de CMP une 1 mol de calcio, independientemente del pH. Este sitio estaría relacionado con el grupo fosfato de Ser 44. En las condiciones de alto calcio libre (sitio de baja afinidad), el CMP une más moles de calcio al aumentar el pH de 7 a 9, con un valor mínimo de 6 moles a pH 7 y máximo de 14 moles a pH 9, por mol de CMP.

Palabras clave: caseinomacropéptido, electrodo selectivo de calcio, gráfico de Klotz, calcio libre

ABSTRACT

The caseinomacropeptide (CMP) is a highly hydrophilic bioactive peptide with 64 amino acids obtained from a specific enzymatic cleavage of κ-casein by pepsin or chymosin obtained from cheese making. The study of the CMP affinity for calcium is very important in order to increase the bioavailability of the mineral in the body. The aim of this study was to evaluate the binding ability of the CMP with calcium through the use of a calcium-selective electrode. The information collected was plotted on a Klotz graph in order to obtain the apparent association constant (K_{ap}) and maximum bound calcium. It is shown that when there is low concentration of free calcium (high affinity site) one mole of CMP binds 1 mole of calcium, independent of pH. This may be related to Ser 44 phosphate group. On the other hand, when there is high concentration of free calcium (low affinity site), CMP binds more moles calcium when it raises from pH 7 to 9, with a minimum value of 6 moles at pH 7 and a maximum of 14 moles at pH 9, per mole of CMP.

Keywords: caseinomacropeptide, calcium ion selective, Klotz plots, free calcium

INTRODUCCIÓN

El calcio que está presente en los alimentos que ingerimos se encuentra en forma de sales o combinado con otros nutrientes y necesita de la presencia del HCl del estómago para ser ionizado a Ca^{2+} soluble. El 90% de la absorción del calcio tiene lugar en el intestino delgado (Wasserman, 2004) a través de su forma ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble (Gueguen y Pointillart, 2000). Pero el nivel de absorción es

bajo, por varios factores: principalmente porque el calcio interacciona con los demás componentes de la dieta formando complejos insolubles, porque es difícil la absorción de cationes divalentes (como el calcio o el magnesio) en la mucosa intestinal y porque las sales de calcio en las condiciones del intestino (pH 7 a 8,5) son insolubles (Eckert et al., 2014). El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo altamente hidrofílico de 64 aminoácidos obtenido de la ruptura enzimática específica de la □-caseína por la pepsina o quimosina durante la elaboración del queso. La exploración de la afinidad del CMP por el calcio es muy importante para incrementar la biodisponibilidad del calcio en la población.
El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP a través de la utilización de un electrodo selectivo de calcio a 25ºC y una determinada fuerza iónica de 0,05 M KCl y diferente condición de pH (7,0, 8,0 y 9,0).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó caseinomacropéptido, BioPURE-GMP® de Davisco Foods International (USA). Su pureza, según el proveedor, fue (en base seca): 90,0 ± 3,0% (p/p) de CMP (N x 7,07). Los minerales fueron determinados mediante espectrometría de absorción atómica previa calcinación en mufla a 500ºC con un espectrómetro Analyst 200 Perkin Elmer (USA). La composición de minerales fue la siguiente (100 g de muestra): 950 mg de Na; 125 mg de K y 682 mg de Ca. Se utilizó $CaCl_2$ anhidro (Merck, Alemania). El agua utilizada fue Milli-Q (2,26 ± 0,07 □S/cm). Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Determinación de calcio libre

El calcio ligado se determinó por el método de Berrocal et al. (1989). Se titularon 50 mL de una solución de 2 g/L de CMP (Davisco Foods International) en agua ultrapura a la cual se le adicionó 0,705 mL de 3,5 M KCl para ajustar la fuerza iónica. Los ensayos se realizaron por triplicado y a 25ºC.
La calibración del electrodo se realizó paralelamente a las titulaciones en agua ultrapura con la misma condición de pH y fuerza iónica. Para el tratamiento de los datos se verificó la respuesta del electrodo sea lineal. El calcio libre se midió con electrodo de ión selectivo modelo HI4104 conectado a un pHmetro modelo HI98191 (Hanna Instruments, USA) después de la adición sucesiva de 50 □L de $CaCl_2$ 0,2 M a la solución. El volumen máximo agregado fue de 2 mL. El calcio ligado se obtuvo restando al calcio total presente en la solución, el calcio libre determinado (Ca_f). El pH se mantuvo en todo momento a 7, 8 y 9 con el agregado de NaOH de alta normalidad. Los valores de pH fueron seleccionados por favorecer la unión de calcio tanto a los grupos fosfatos como carboxilatos (Mekmene y Gaucheron, 2011)

Tratamiento de los datos experimentales

La constante de asociación aparente y el número de sitios unidos al calcio se determinaron a través de un ajuste de los datos experimentales a un modelo teórico (Berrocal et al., 1989).
El calcio unido por mg de CMP (r) fue obtenido restando el calcio libre al calcio total y dividiendo por la concentración de CMP. Los datos obtenidos fueron representados en una gráfica de Klotz (Lee et al., 1977) para obtener la constante de asociación aparente (K_{ap}) y el máximo calcio unido por mg de CMP (n_i).

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{ni\ Kap\ Caf} + \frac{1}{ni} \quad (1)$$

Se consideró que un mol de CMP tiene una masa molecular promedio de 7500 Da.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v. 15 (IBM, IL; USA). Se aplicó el test de Levene de homogeneidad de las varianzas. El test de Tukey fue utilizado cuando las varianzas fueron homogéneas y el de Games-Howell cuando no fueron homogéneas.

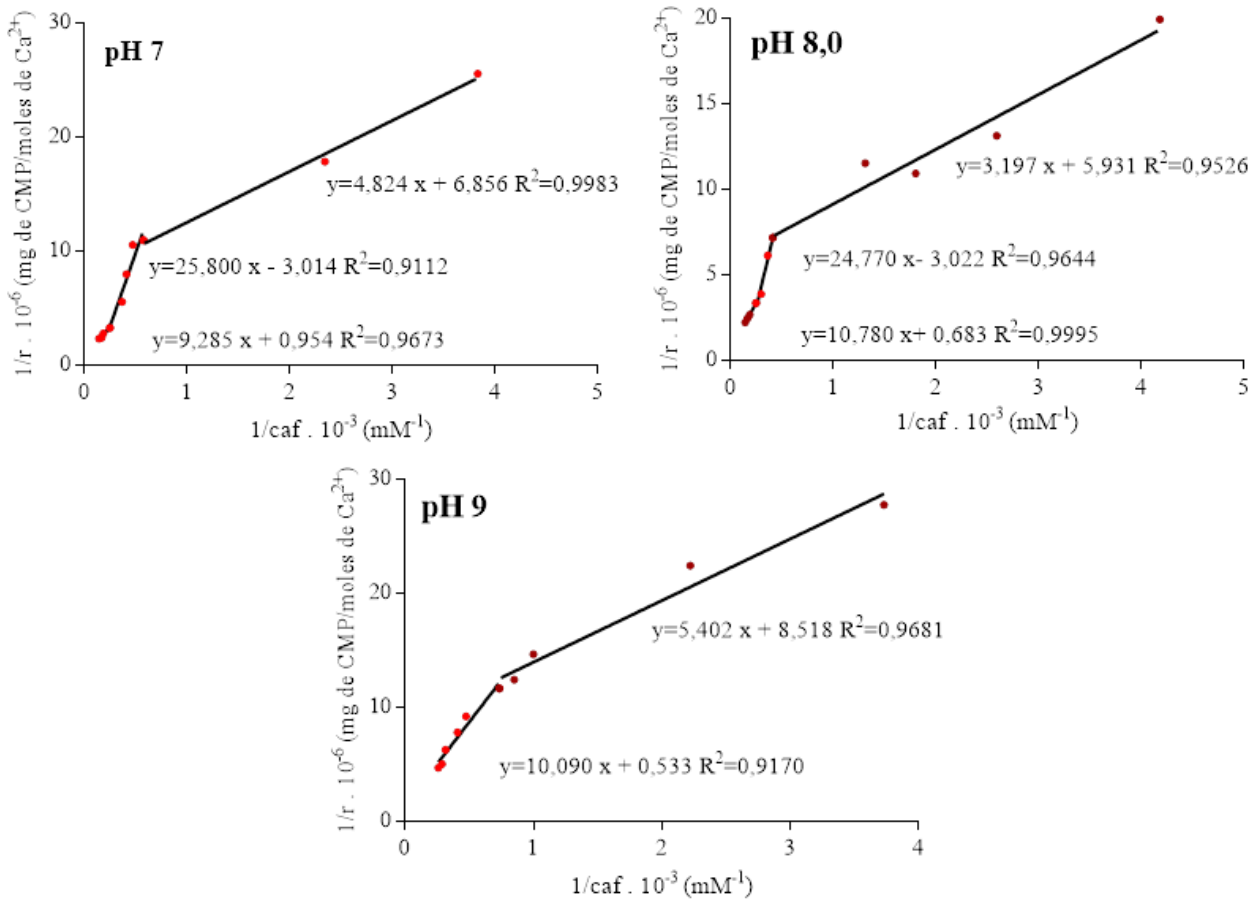


Figura 1. Gráficos de Klotz para CMP a pH 7,0; 8,0 y 9,0 con una fuerza iónica de 0,05 M de KCl

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** muestra los gráficos de Klotz obtenidos al graficar el calcio unido vs calcio libre según la Ecuación 1. El ajuste de los datos fue realizado con diferentes rectas, evidenciando sitios de unión no definidos en la molécula de CMP (Berrocal et al., 1989). Los ajustes de las curvas fueron altos (superiores a 0,9170). Las constantes obtenidas del ajuste matemático de los datos en la condición de bajo calcio libre (altos valores de $1/Ca_f$) están mostrados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Constantes de asociación aparente y máximo calcio unido por mol de CMP en condiciones de bajo calcio libre. Se asumió una masa molecular para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (M^{-1})	1806	1862	1582
n_i (moles de Ca^{2+}/mol de CMP	0,93 □ 0,04[a]	1,26 □ 0,21[a]	0,87 □ 0,12[a]

Letras diferentes representan diferencias significativas a $p > 0,05$

La cantidad máxima de calcio unido fue independiente del pH, siendo este valor cercano a 1 mol de Ca^{2+} por

mol de CMP, este valor correspondería a un sitio de alta afinidad con el calcio, relacionado con el contenido de fósforo de la molécula (Berrocal et al., 1989). En el caso del CMP, el residuo de Ser en posición 44 se encuentra siempre fosforilado (Mercier y Vilotte, 1993).

Tabla 2. Constantes de asociación aparente y máximo calcio unido por mol de CMP en condiciones de alto calcio libre. Se asumió una masa molecular para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (M^{-1})	102,8	63,4	33,4
n_i (moles de Ca^{2+}/mol de CMP)	7,9 □ 1,8[a]	11,0 □ 0,48[a]	14,0 □ 0,6[a]

Letras diferentes representan diferencias significativas a p > 0,05

En las zonas intermedias (entre bajas y altas concentraciones de calcio libre), el modelo matemático planteado no tuvo sentido físico mostrando una ordenada al origen negativa (**Figura 1** pH 7 y 8). En condiciones de alto calcio libre (bajo $1/Ca_f$), se encontró que la cantidad máxima de calcio unido aumentó con el crecimiento del pH desde 7 a 9 (**Tabla 2**). En este caso, un mol de CMP unió entre 8 y 14 moles de calcio. La dependencia con el pH del número de calcio unido también fue encontrada por Ellegård et al. (1999) para caseinofosfopéptidos. La K_{ap} disminuyó con el pH desde 102,8 (pH 7) a 33,4 M^{-1} (pH 9). Estos valores fueron inferiores a aquellos encontrados en la bibliografía para caseinofosfopéptidos. Mekmene et al. (2011) determinaron una K_{ap} de 191 M^{-1} y Berrocal et al. (1989) una K_{ap} de 189 M^{-1} para caseinofosfopéptidos de aproximadamente 2000 Da.

El CMP tiene ocho residuos de Glu correspondientes a las posiciones 13, 24, 32, 35, 42, 46, 49 y 53 y dos residuos de Asp en las posiciones 10 y 43 (Brody, 2000). El ácido siálico se encuentra en el CMP en cantidades variables, aproximadamente el 50% del CMP está glicosilado (Thomä-Worringer et al., 2006), y el ácido siálico se encuentra entre un 5 y 11% en peso del total de CMP, dependiendo del origen y modo de obtención del CMP (Fernando y Woonton, 2010). La masa molecular del ácido siálico es 309 g/mol, por consiguiente, se puede estimar que un mol de CMP contiene entre 1,2 y 2,7 moles de ácido siálico. Según Jaques et al., 1977, el complejo formado por la unión entre siálico y calcio es 1:1. Esto sugiere que los grupos carboxilados (residuos de glutamato y aspártico) serían los involucrados en la unión del calcio al CMP (Mekmene et al., 2011) además del ácido siálico (Jaques et al., 1977) y el residuo fosforilado.

CONCLUSIONES

Se concluye que en condiciones de bajo calcio libre (sitio de baja afinidad) un mol de CMP une 1 mol de calcio, independientemente del pH. Este sitio estaría relacionado con el grupo fosfato del residuo de Ser 44. En las condiciones de alto calcio libre (sitio de alta afinidad), el CMP une más moles de calcio al aumentar el pH de 7 a 9, con un valor mínimo de 6 moles a pH 7 y máximo de 14 moles a pH 9, por mol de CMP.

BIBLIOGRAFÍA

Berrocal, Rafael, Chanton Serge, Juillerat Marcel A., Favillare Blaise, Scherz Jean-Claude yJost Rolf. 1989. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. Journal of Dairy Research, 56(3), 335-341.

Brody, Ernest P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. British Journal of Nutrition, 84(SupplementS1), 39-46.

Eckert, Ewelina, Bamdad Fatemeh y Chen Lingyun. 2014. Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. Food Chemistry, 159(0), 498-506.

Ellegård, Katrine H., Gammelgård-Larsen Claus, Sørensen Esben S. y Fedosov Sergey. 1999. Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. International Dairy Journal, 9(9), 639-652.
Fernando, Susil Francis y Woonton Brad William. 2010. Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP). Journal of Food Composition and Analysis, 23(4), 359-366.
Gueguen, L. y Pointillart A. 2000. The bioavailability of dietary calcium. Journal of the American College of Nutrition, 19, 119S-136S.
Jaques, Larry W., Brown Ellen B., Barrett Joy M., Brey Wallace S. y Weltner William. 1977. Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate. The Journal of Biological Chemistry, 252, Nº 13, 4533-4538.
Lee, Sandra L., Veis Arthur y Glonek Thomas. 1977. Dentin phosphoprotein: an extracellular calcium-binding protein. Biochemistry, 16(13), 2971-2979.
Mekmene, Omar y Gaucheron Frédéric. 2011. Determination of calcium-binding constants of caseins, phosphoserine, citrate and pyrophosphate: A modelling approach using free calcium measurement. Food Chemistry, 127(2), 676-682.
Mercier, Jean-Claude y Vilotte Jean-Luc. 1993. Structure and Function of Milk Protein Genes. Journal of Dairy Science, 76(10), 3079-3098.
Thomä-Worringer, C., Sørensen John y López-Fandiño Rosina. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 16(11), 1324-1333.
Wasserman, R. H. . 2004. Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption. The journal of Nutrition, 134, 3137-3139.

AGRADECIMIENTOS
Al Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (Proyecto PICT-2014-1402), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) y al ITAPROQ-CONICET.

Evaluación de la influencia del caseinomacropéptido en la biodisponibilidad de calcio: solubilidad en buffer fosfato

Loria, KG [1,4]; Aragón, JC [2]; Torregiani S [3]; Gómez, GA [5]; Pighin A [5]; Pilosof, AMR [6,7]; Farías, ME [4,6]

(1) Becaria de Estudio de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.
(2) Becaria CIN 2015 (Consejo Interuniversitario Nacional)
(3) Pasante Interno Rentado, Universidad Nacional de Luján.
(4) Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7 (6700), Luján, Argentina.
(5) Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7 (6700), Luján, Argentina.
(6) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
(7) ITAPROQ-CONICET. Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
efarias@mail.unlu.edu.ar

RESUMEN

Una forma de predecir la biodisponibilidad del calcio es evaluando su solubilidad en una solución buffer fosfato (donde las sales de calcio son insolubles). El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo altamente soluble obtenido del suero de queso. El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia del CMP en la solubilidad de las sales $CaCl_2$ y $CaCO_3$ en buffer fosfato de sodio a pH 7,8. Los resultados mostraron que la solubilidad de las sales $CaCl_2$ y $CaCO_3$ en buffer fosfato fue muy baja (3,2 ± 0,8 y 3,3 ± 0,9 mg L^{-1}), y aumentó en presencia de 1 g L^{-1} de CMP en un 390%. Cuando se revierte el pH del CMP (por ejemplo desde 7,0 a 3,5 y se vuelve a 7,0), el tipo de anión del ácido utilizado (cloruro, citrato, lactato, fosfato, acetato) queda remanente en la solución de CMP. En presencia de los aniones remanentes cloruro, citrato y fosfato la solubilidad de ambas sales ($CaCl_2$ y $CaCO_3$) se incrementó. Estos resultados pueden relacionarse con la alta afinidad con el calcio de los aniones citrato y fosfato como también del ácido siálico producto de la hidrólisis ácida de los grupos glicosilados del CMP.

Palabras clave: caseinomacropéptido, solubilidad de calcio, biodisponibilidad de calcio

ABSTRACT

One way to predict the calcium bioavailability is by evaluating its solubility in a phosphate buffer solution (where calcium salts are insoluble). Caseinomacropeptide (CMP) is a highly soluble bioactive peptide obtained from cheese whey. The aim of this study was to analyze the influence of CMP in the solubility of $CaCO_3$ and $CaCl_2$ salts in sodium phosphate buffer at pH 7.8. Results showed that the solubility of $CaCO_3$ and $CaCl_2$ salts in phosphate buffer solution was very low (3.2 ± 0.8 and 3.3 ± 0.9 mg L^{-1}), and increased a 390 percent in the presence of CMP (1 g L^{-1}). When the pH of the CMP is reversed (for instance from 7.0 to 3.5 and back to 7.0), the anion of the employed acids (chloride, citrate, lactate, phosphate, acetate) remains in solution. In the presence of chloride, citrate and phosphate anions, the solubility of both salts ($CaCl_2$ and $CaCO_3$) increased. These results may be related to the high affinity of calcium with citrate and phosphate anions, as well as to the sialic acid which comes from the acid hydrolysis of glycosylated CMP.

Keywords: caseinomacropeptide, solubility of calcium, calcium bioavailability

INTRODUCCIÓN

El calcio es un mineral vital para el organismo y su presencia en el cuerpo humano depende exclusivamente

del consumo en la dieta. En Argentina, el requerimiento de calcio para un organismo adulto de entre 19 y 50 años es de 1000 mg/día (FAO, 2001). El calcio del organismo cumple importantes funciones, por ejemplo, la constitución de fluidos y tejidos, la regulación cardíaca y la contracción muscular, la conducción neuronal y el mantenimiento de la estructura y calidad de la masa ósea. Además, como componente de los sistemas enzimáticos, es estimulante de la secreción hormonal, la proliferación celular y la coagulación sanguínea (Sánchez, 2011).

El calcio que está presente en los alimentos que ingerimos, se encuentra en forma de sales o combinado con otros nutrientes y necesita de la presencia del HCl del estómago para ser ionizado a Ca^{2+} soluble. El 90% de la absorción del calcio tiene lugar en el intestino delgado (Wasserman, 2004) a través de su forma ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble (Gueguen y Pointillart, 2000). Pero el nivel de absorción es bajo, por varios factores: principalmente porque el calcio interacciona con los demás componentes de la dieta formando complejos insolubles, porque es difícil la absorción de cationes divalentes (como el calcio o el magnesio) en la mucosa intestinal y porque las sales de calcio en las condiciones del intestino (pH 7 a 8,5) son insolubles (Eckert et al., 2014). De hecho del 70 al 80% de calcio de la dieta es excretado con las heces.

El depósito de calcio en el cuerpo depende de varios factores como la ingesta dietética, la absorción intestinal, la excreción renal y el remodelamiento óseo (Portela, 2015). Por lo tanto, estudiar la biodisponibilidad de calcio, que es una forma de indicar cuánto de éste se absorbe realmente durante la digestión, es un tema de elevado interés.

El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo altamente soluble obtenido del suero de queso. Este péptido posee un alto contenido de ácido siálico y una cadena peptídica rica en Glu y Asp, lo cual le confiere una elevada carga negativa a pH superior a 4,5. Estas características son motivadoras para analizar sus interacciones con sales de calcio de bajo costo y amplio uso en la industria alimentaria. A pH neutro y en agua destilada, el $CaCl_2$ es reconocido por su alta solubilidad (74,5 g/L), en cambio, la solubilidad del $CaCO_3$ es muy baja (0,1 mg L^{-1}). El primer objetivo de este trabajo fue analizar la influencia del CMP en la solubilidad de las sales $CaCO_3$ y $CaCl_2$ en buffer fosfato de sodio a pH 7,8, condiciones que simulan el intestino. Cuando se revierte el pH del CMP (por ejemplo desde 7,0 a 3,5 y se vuelve a 7,0), el tipo de anión del ácido utilizado (cloruro, citrato, lactato, fosfato, acetato) podría afectar la solubilidad de las sales de calcio. Por ello, el segundo objetivo del trabajo fue analizar el efecto del tipo de anión utilizado al cambiar el pH del CMP, sobre solubilidad de las sales mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se utilizó caseinomacropéptido, BioPURE-GMP® de Davisco Foods International (USA). Su pureza, según el proveedor, fue (en base seca): 90,0 ± 3,0% (p/p) de CMP (N x 7,07). Los minerales fueron determinados mediante espectrometría de absorción atómica previa calcinación en mufla a 500ºC con un espectrómetro Analyst 200 Perkin Elmer (USA). La composición de minerales fue la siguiente (100 g de muestra): 950 mg de Na; 125 mg de K y 682 mg de Ca. El contenido de ácido siálico reportado por la bibliografía es del 7% (p/p) (Fernando y Woonton, 2010).

Se utilizó $CaCl_2$ anhidro (Merck, Alemania) y $CaCO_3$ anhidro (Biopack, Argentina). La solución buffer fosfato de sodio fue preparada con 3,7 ml de solución de dihidrógeno fosfato de potasio 0,066M y 96,3 ml de solución de dihidrógeno fosfato de sodio 0,066M. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. El agua utilizada fue Milli-Q (2,26 ± 0,07 □S/cm). Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras de CMP con reversión de pH

La cantidad apropiada de una muestra en polvo de CMP se disolvió para obtener una concentración de 20 g L^{-1}. El pH de la solución se ajustó a 7,0. Un volumen de 50 mL de solución de CMP se ajustó a pH 3,5. Para ello se utilizaron diferentes ácidos (ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido acético, ácido fosfórico y ácido láctico) de alta normalidad para evitar dilución. La solución de CMP se mantuvo en ese pH durante 1 hora bajo agitación constante. Pasado ese tiempo el pH fue ajustado nuevamente a 7,0 con NaOH (0,1 N). El aumento de volumen por el cambio de pH en todos los casos fue inferior al 2%.

Determinación de la capacidad de unión con calcio del CMP

La capacidad de unión del catión calcio con el CMP se determinó por el método de Jung et al. (2006). Muestras con concentraciones entre 0 y 10 g L^{-1} fueron mezcladas en 20 mM de buffer fosfato de sodio (pH 7,8) y 5 mM $CaCl_2$. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 30 min con agitación continua a través de una barra magnética. El pH se mantuvo en todo momento en 7,8. El fosfato de calcio obtenido fue removido por centrifugación a 2000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se filtró a través de filtros jeringa con membrana de Nylon® de 0,45 m de diámetro.

Para los ensayos con $CaCO_3$ (Chen et al., 2014; Zhao et al., 2014), las concentraciones finales de las mezclas fueron 20 mM de buffer fosfato de sodio, 6 mM de $CaCO_3$ y 0,5 g L^{-1} de CMP. Para lograr esa concentración de $CaCO_3$ se tomó la alícuota correspondiente de una solución sobresaturada 0,01 M de dicha sal en agua bajo agitación constante. Se procedió con la mezcla como se describió arriba.

El contenido de calcio de la muestra de CMP fue sumado al contenido total. Los experimentos fueron realizados por duplicado o triplicado.

Determinación de calcio en los complejos CMP/Ca

El calcio contenido en el sobrenadante fue determinado por espectrometría de absorción atómica con un espectrómetro (Modelo AAnalyst 400, Perkin Elmer, CA, USA). Previamente se agregó nitrato de lantano (1,5% p/v) a estándares, muestras y blancos para evitar la interferencia de fosfatos. La curva de calibración se construyó a través de soluciones estándares de calcio entre 2 y 20 ppm, graficando la absorbancia en función de las ppm de calcio.

La relación Ca^{2+}/CMP se calculó con la siguiente ecuación (Guo et al., 2015):

$$\text{Relación mmoles de } Ca^{2+}/\text{g CMP} = C/(40*C_{CMP})$$

(Ecuación 1)

Siendo:

C: (calcio soluble en el sobrenadante con CMP – calcio soluble en el sobrenadante sin CMP) (mg L^{-1})

C_{CMP}: Concentración de CMP (g L^{-1})

40 es la masa molecular del calcio (g mol^{-1}).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v. 15 (IBM, IL; USA). Se aplicó el test de Levene de homogeneidad de las varianzas. El test de Tukey fue utilizado cuando las varianzas fueron homogéneas y el de Games-Howell cuando no fueron homogéneas.

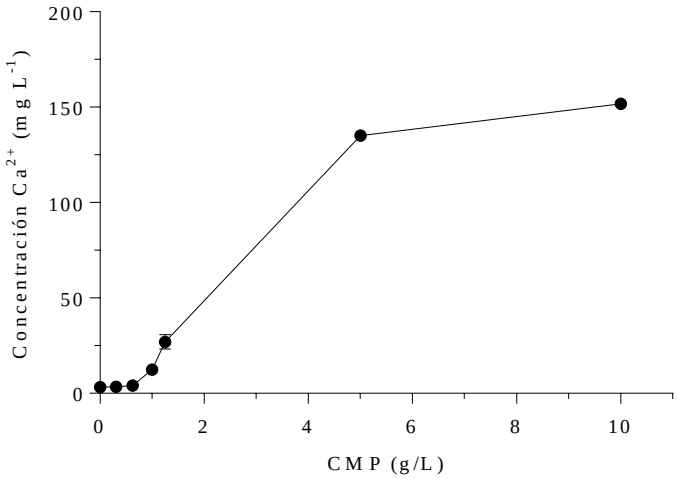


Figura 1. Calcio soluble en función de la concentración de CMP. Las concentraciones de $CaCl_2$ y buffer fosfato de sodio fueron 5 mM y 20 mM respectivamente. Las barras representan el desvío estándar (n=2 o 3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La solubilidad del $CaCl_2$ en buffer fosfato de sodio a pH 8,0 fue muy baja (3,22 ± 0,84 mg L^{-1}) debido a la formación de fosfato de calcio insoluble. La Figura 1 muestra como el calcio soluble dependió de la concentración de CMP utilizada en el ensayo y es una medida de la formación del complejo CMP-Ca. En presencia de 1,0 g L^{-1} de CMP, la solubilidad aumentó un 390% (12,44 ± 0,52 mg L^{-1}). El CMP inhibió la formación de fosfato de calcio a concentraciones superiores a 0,5 g L^{-1}.

Según la Ecuación 1, la relación moles de calcio soluble/g de CMP dependió también de la concentración del péptido siendo 0,20 ± 0,01; 0,49 ± 0,07 y 0,66 ± 0,01 mmoles g^{-1} para concentraciones de CMP de 1,0; 1,3 y 5,0 g L^{-1}, respectivamente. Jung et al. (2006) reportaron para un péptido purificado por cromatografía, obtenido de residuos de espinas del pez *Theragra chalcogramma*, una mayor solubilidad de calcio en buffer fosfato de sodio. El calcio soluble, determinado a través de un electrodo selectivo de calcio, fue 32 mg L^{-1} para 0,25 g L^{-1} de péptido purificado y con un peso molecular de 1442 Da.

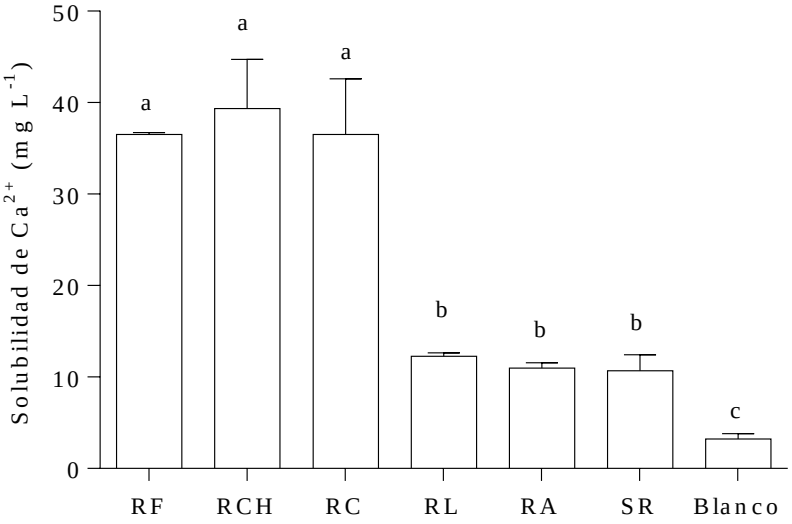


Figura 2. Habilidad de quelar calcio de 1 g L^{-1} de CMP *in vitro* utilizando la metodología de la solubilidad en 20 mM de buffer fosfato de sodio con 5 mM de $CaCl_2$. El pH del CMP fue previamente revertido con diferentes ácidos: RF (ácido fosfórico); RCH (ácido clorhídrico); RC (ácido cítrico); RL (ácido láctico) y RA (ácido acético). La muestra SR correspondió a CMP que no sufrió reversión de pH. Blanco: solubilidad de calcio en ausencia de CMP. Las barras representan el desvío estándar (n=2 o 3).

La segunda parte del ensayo consistió en evaluar el aumento de la capacidad quelante de calcio del CMP cuando el péptido sufrió un cambio de pH (desde pH neutro hasta 3,5 y regreso a neutro). Este ensayo simula el cambio de pH que se produce en el paso del estómago al intestino. Estudios previos mostraron que el cambio de pH afecta al estado de asociación, ya que inicialmente el péptido se encuentra como monómero a pH 7,0 y al revertir el pH con ácido clorhídrico cambia a la forma dimérica (Farías et al., 2010). La **Figura 2** muestra el efecto en la solubilidad del calcio en buffer fosfato de sodio a pH 7,8 cuando el CMP sufrió un anterior cambio de pH. Las muestras de CMP cuyo pH fue revertido con ácido láctico (RL) y acético (RA) no mostraron diferencias en la solubilidad con aquella sin revertir el pH (SR) ($p > 0,05$). Por otro lado,

cuando se utilizaron los ácidos fosfórico, láctico y acético en la misma operación(muestras RF, RCH y RC), el calcio soluble aumentó mostrando incrementos del 1140% y 290%, respecto a los ensayos Blanco y SR. En estos casos, los complejos CMP-Ca presentaron una relación de 0,85 ± 0,01; 0,92 ± 0,23 y 0,85 ± 0,21 mmoles g^{-1} de CMP para las muestras RF, RCH y RC, respectivamente.

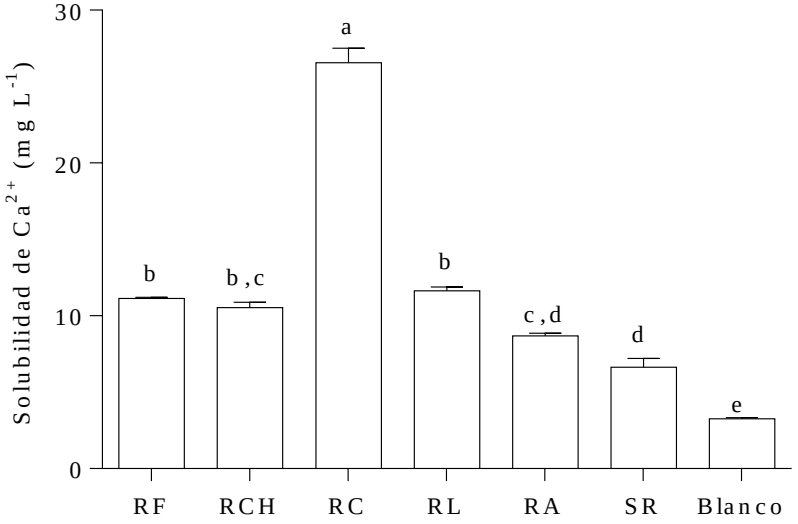


Figura 3. Habilidad de quelar calcio de 0,5 g L^{-1} de CMP *in vitro* utilizando la metodología de la solubilidad en 20 mM de buffer fosfato de sodio con 6 mM de $CaCO_3$. El pH del CMP fue previamente revertido con diferentes ácidos: RF (ácido fosfórico); RCH (ácido clorhídrico); RC (ácido cítrico); RL (ácido láctico) y RA (ácido acético). La muestra SR correspondió a CMP que no sufrió reversión de pH. Blanco: solubilidad de calcio en ausencia de CMP. Las barras representan el desvío estándar (n=3 o 4).

La **Figura 3** muestra la solubilidad de calcio en buffer fosfato de sodio cuando la sal utilizada es $CaCO_3$. La concentración de calcio en ausencia de CMP fue 3,27 ± 0,92 mg L^{-1}, como era de esperar no hubo diferencias significativas (P > 0,05) con respecto al valor obtenido con $CaCl_2$. En presencia de CMP, la solubilidad aumentó un 200% (6,63 ± 0,99 mg L^{-1}). Este valor fue aproximadamente la mitad de aquel obtenido al utilizar $CaCl_2$, relacionado con la menor concentración de CMP utilizada en este caso (0,5 g L^{-1}). En presencia del anión citrato, el aumento de la solubilidad fue de 400% (26,57± 1,62 mg L^{-1}) con respecto a SR. Las muestras RF, RCH y RL tuvieron un incremento del 170% en la concentración de calcio soluble con respecto a SR. Los complejos CMP-Ca presentaron una relación de 0,40 ± 0,01; 0,37 ± 0,03 y 1,17 ± 0,08 mmoles g^{-1} de CMP para las muestras RF, RCH y RC, respectivamente (Ecuación 1).

Puede relacionarse la mayor solubilidad de calcio en las muestras RC y RF de las **Figuras 2** y **3**, con la presencia de iones citrato y fosfato libres, resultantes de la reversión del pH. Ambos, citrato y fosfato son conocidos como agentes quelantes. El citrato tiene más afinidad con el calcio en comparación a las caseínas y los caseinofosfopéptidos (Mekmene y Gaucheron, 2011). Las constantes de asociación con el calcio del fosfato de hidrógeno, fosfato de dihidrógeno y citrato son 501, 12 y 79000, respectivamente (Vavrusova y Skibsted, 2014). Estos resultados explicarían la mejora de la solubilidad de las muestras RF y RC para las dos sales estudiadas.

La cadena peptídica del CMP se encuentra glicosilada, siendo el ácido siálico el glicósido más abundante (Thomä-Worringer et al., 2006). Siegert, Tolkach & Kulozik (2012) encontraron que los pH ácidos son responsables de la hidrólisis de los glicanos de la cadena peptídica del CMP durante el calentamiento y el almacenamiento, aún a temperatura de 5ºC. El CMP en los ensayos realizados, se mantuvo durante 1 hora a pH 3,5, condición suficiente para hidrolizar parcialmente a los grupos glicosilados. La liberación del ácido siálico, considerado quelante de calcio con una constante de asociación de 121 (Jaques et al., 1977), sería el responsable de la presencia de más calcio soluble.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se estableció que un mol de CMP, con peso molecular de 7500 Da, une entre 1,5 y 5 moles de calcio. Sin embargo, un tratamiento del CMP con los ácidos fosfórico, cítrico o clorhídrico aumentó su capacidad ligante entre 6 y 7 moles de calcio por mol de CMP. Estos resultados pueden relacionarse con la alta afinidad con el calcio de los aniones citrato y fosfato como también del ácido siálico, producto de la hidrólisis ácida de los grupos glicosilados del CMP.

BIBLIOGRAFÍA

Chen, Da, Mu Xinmin, Huang Hai, Nie Ruiyan, Liu Zunying yZeng Mingyong. 2014. Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats. Journal of Functional Foods, 6, 575-584.

Eckert, Ewelina, Bamdad Fatemeh y Chen Lingyun. 2014. Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. Food Chemistry, 159(0), 498-506.

FAO. 2001. Human Vitamin and Mineral Requirements, Report 07a. Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand,.

Farías, M. E., Martinez M. J. y Pilosof A. M. R. 2010. Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. International Dairy Journal., 20, 79–88.

Fernando, Susil Francis y Woonton Brad William. 2010. Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP). Journal of Food Composition and Analysis, 23(4), 359-366.

Gueguen, L. y Pointillart A. 2000. The bioavailability of dietary calcium. Journal of the American College of Nutrition, 19, 119S-136S.

Guo, Lidong, Harnedy Pádraigín A., O'Keeffe Martina B., Zhang Li, Li Bafang, Hou Hu et al. 2015. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. Food Chemistry, 173, 536-542.

Jacobo Díaz Portillo, María Teresa Fernández del Barrio, Fernando Paredes Salido. 1997. Metabolismo Fosfocálcico. In E. D. d. Santos (Ed.), Aspectos básicos de bioquímica clínica, (pp. 293). Madrid, España.

Jaques, Larry W., Brown Ellen B., Barrett Joy M., Brey Wallace S. y Weltner William. 1977. Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate. The Journal of Biological Chemistry, 252, Nº 13, 4533-4538.

Jung, Won-Kyo, Karawita Rohan, Heo Soo-Jin, Lee Bae-Jin, Kim Se-Kwon yJeon You-Jin. 2006. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (Theragra chalcogramma) backbone by pepsinolytic hydrolysis. Process Biochemistry, 41(9), 2097-2100.

Mekmene, Omar y Gaucheron Frédéric. 2011. Determination of calcium-binding constants of caseins, phosphoserine, citrate and pyrophosphate: A modelling approach using free calcium measurement. Food Chemistry, 127(2), 676-682.

Portela, María Luz P.M de. 2015. Calcio. In Aspectos Nutriiconales de Vitaminas y Minerales en el siglo XXI Primera edición ed., (pp. 208-225): Asociación Argentina de Vitaminas y Minerales en el Siglo XXI.

Sánchez, Francia Elena Valencia García | María Orfilia Román Morales | Diana Patricia Cardona. 2011. El calcio en el desarrollo de alimentos funcionales In Revista Lasallista de Investigación, (pp. 104-116).

Siegert, Nadja, Tolkach Alexander y Kulozik Ulrich. 2012. The pH-dependent thermal and storage stability of glycosylated caseinomacropeptide. LWT - Food Science and Technology, 47(2), 407-412.

Thomä-Worringer, C., Sørensen John y López-Fandiño Rosina. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 16(11), 1324-1333.

Vavrusova, Martina y Skibsted Leif H. 2014. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. LWT - Food Science and Technology, http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.034.

Wasserman, R. H. . 2004. Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption. The journal of Nutrition, 134, 3137-3139.

Zhao, Lina, Huang Shunli, Cai Xixi, Hong Jing y Wang Shaoyun. 2014. A specific peptide with calcium

chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. Journal of Functional Foods, 10, 46-53.

AGRADECIMIENTOS
A los Departamentos de Tecnología y Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (Proyecto PICT-2014-1402), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) y al ITAPROQ-CONICET.

Efecto de la presencia de NaCl y $CaCl_2$ sobre la dinámica de la gelificación, el color y la textura del caseinomacropéptido

Loria, K.G. [1,3]; Aragón, J.C. [2]; Pilosof, A.M.R. [4,5] y Farías, M.E. [3,4]

(1) Becaria de Estudio de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.
(2) Becaria CIN 2015 (Consejo Interuniversitario Nacional)
(3) Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7 (6700), Luján, Argentina.
(4) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
(5) ITAPROQ-CONICET. Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
efarias@mail.unlu.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades reológicas (dinámica de la gelificación y la viscoelasticidad), la textura y color de geles de caseinomacropéptido (CMP) al 12% (p/p) en presencia de distintas concentraciones de NaCl y $CaCl_2$ a pH 3,5. El módulo de almacenamiento al final del enfriamiento del CMP en ausencia de las sales fue 95,8 ± 7,4 kPa y el tiempo de gelificación (cruce entre G' y G'') fue 5 ± 1 min. Ambos parámetros no fueron afectados por la presencia de NaCl o $CaCl_2$ ($p>0,5$). Los barridos de frecuencia mostraron que *G'* fue independiente de la frecuencia de oscilación, evidenciando geles fuertes. No hubo diferencias en las características texturales (dureza, adhesividad, resiliencia, cohesión y elasticidad) de los geles a diferentes concentraciones de NaCl o $CaCl_2$. No se observaron diferencias en los parámetros de color de los geles con NaCl, sin embargo sí en presencia de $CaCl_2$ a concentraciones ≥ 0,10M, relacionado con la transparencia.

Se concluye que las sales no afectaron las propiedades de gelificación y texturales del CMP. Sin embargo, el cambio de color de los geles en presencia de $CaCl_2$ evidenció agregados de tamaño más pequeño.

Palabras clave: caseinomacropéptido, gelificación, textura, color

ABSTRACT

The aim of this work was to study the rheological properties (dynamic of gelation and viscoelasticity), texture and color of caseinomacropeptide (CMP) gels (12% w/w) in the presence of different concentrations of NaCl and $CaCl_2$ at pH 3.5. The storage modulus at the end of cooling in the absence of salts was 95.8 ± 7.4 kPa and gelation time (intersection between *G'* and *G''*) was 5 ± 1 min. These parameters were not affected by the presence of NaCl or $CaCl_2$ ($p> 0.5$). Frequency sweeps showed that *G'* did not depend on the oscillation frequency, which means strong gels. As regards texture (hardness, adhesiveness, resilience, cohesiveness and elasticity), there were no differences between gels with different concentrations of salts. There were no color differences in NaCl gels, nonetheless those where concentration of $CaCl_2$ reached 0,10M or more showed differences that can be related to transparency.

In conclusion, NaCl and $CaCl_2$ salts did affect neither gelation nor textural properties of CMP. However, the changing of color in the presence of $CaCl_2$ showed smaller size of aggregates.

Keywords: caseinomacropeptide, gelation, texture, color.

INTRODUCCIÓN

Durante la elaboración del queso, la □-caseína se rompe enzimáticamente en un enlace específico, obteniendo así el coágulo, que formará el queso y el suero. El caseinomacropéptido (CMP) es la porción

hidrofílica de la □-caseína y por su alta solubilidad se encuentra presente en el suero. El CMP presenta un gran interés por sus propiedades bioactivas y tecnológicas (Thöma-Worringer et al., 2006).
En un medio de muy baja fuerza iónica se ha mostrado que el CMP a pH < 4,5 se autoensambla en el tiempo y gelifica espontáneamente a temperatura ambiente (Farías et al., 2010). También se ha estudiado su autoensamblaje en presencia de sales (NaCl y $CaCl_2$) (Farías y Pilosof, 2014). Se encontró que a pH 3,5 y elevadas concentraciones de cloruro de calcio (superior a 1,2 milimoles de $CaCl_2$/g de CMP) producen una disminución de la velocidad de autoensamblaje del CMP o incluso pueden suprimirla, posiblemente por neutralización de las cargas necesarias para que ocurran interacciones electrostáticas (Farías et al., 2014).
Con respecto a sus propiedades de gelificación, se estudiaron en diferentes condiciones de pH (Farías et al., 2010), temperatura (Martinez et al., 2011), concentración (Farías y Pilosof, 2009), presencia de□□-lactoglobulina (Martinez et al., 2010) y polifenoles de té verde (von Staszewski et al., 2012). Sin embargo, no se realizó un estudio detallado del efecto de las sales (NaCl y $CaCl_2$) en la gelificación del CMP a pH 3,5, como tampoco un análisis de la textura y color de los geles formados. Este trabajo tiene como objetivo analizar el efecto de la concentración de la sal NaCl o $CaCl_2$ en la gelificación, textura y color de geles de CMP a pH 3,5.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó caseinomacropéptido, BioPURE-GMP® de Davisco Foods International (USA). Su pureza, según el proveedor, es: 90,0 ± 3,0% (p/p, en base seca) de CMP (N x 7,07). Los minerales fueron determinados mediante espectrometría de absorción atómica, previa calcinación en mufla a 500 ºC, con un espectrómetro Analyst 200 Perkin Elmer (USA). La composición de minerales fue la siguiente (100 g de muestra): 950 mg de Na; 125 mg de K y 682 mg de Ca. El contenido de ácido siálico reportado por la bibliografía es del 7% (p/p) (Fernando y Woonton, 2010).
Se utilizó $CaCl_2$ anhidro (Merck, Alemania) y NaCl (Anedra, Nueva Zelandia). Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. El agua utilizada fue Milli-Q (2,26 ± 0,07 □S/cm). El pH de todos los sistemas se ajustó a 3,5 con HCl 1 N.

Dinámica de gelificación y propiedades viscoelásticas de los geles

La dinámica de gelificación de las soluciones de CMP 12% (p/p) con concentraciones variables de $CaCl_2$ o NaCl (0 a 0,25 M) se registró en un reómetro de esfuerzo de corte controlado Paar Physica (MCR 301) (Graz, Austria) con una geometría cono plato PP25 con un gap de 1 mm. Inmediatamente luego de ajustar el pH, se vertieron 490 □l de solución de CMP en el plato del reómetro. La temperatura fue controlada por un sistema Peltier (Viscotherm VT2, Paar Physica). Se aplicó en la superficie expuesta parafina para evitar la evaporación de las muestras. La frecuencia fue de 1 Hz y la deformación 0,01%, condiciones correspondientes a la región de viscoelasticidad lineal. Se registró la evolución de *G'*, *G''* y la tangente del ángulo de pérdida, *tan δ*. Las muestras fueron rápidamente calentadas desde 25ºC hasta alcanzar en un minuto la temperatura de los ensayos (70ºC) que se mantuvo constante durante 30 minutos, tiempo suficiente para permitir que *G'* alcance el equilibrio. Luego se enfrió el sistema a 25ºC en 10 min. Se eligió la temperatura de 70ºC con el objeto de acelerar los ensayos según Martínez et al. (2011)
Las propiedades viscoelásticas del gel formado se midieron en función de la frecuencia de oscilación entre 0,05 y 10 Hz a 25 ºC con la misma deformación, 0,01% (Farías y Pilosof, 2016)
El grado de dependencia de *G'* con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante n según la siguiente ecuación (Stading y Hermansson, 1990):

$$\log G' = n.\log f + K \qquad (1)$$

donde, G' es el modulo elástico, f la frecuencia de oscilación y K una constante.

La dependencia del módulo elástico con la frecuencia da información sobre el tipo de estructura que presenta el gel (Stading et al., 1990). Los datos informados son la media de duplicados.

Formación de geles para determinación de color y textura

Los geles de CMP se formaron a temperatura ambiente con 10 ml de cada uno de los sistemas, en recipientes herméticos y cilíndricos de plástico de 2,5 cm de diámetro y 4 cm de altura. Una vez gelificados se almacenaron 24 hs bajo refrigeración antes de realizar los ensayos de color y textura. Como los geles de CMP no se autosoportaron, los ensayos de propiedades texturales y de color se realizaron con el recipiente en el cual fueron preparados.

Color de los geles

Se comparó el color de los sistemas inmediatamente después de ajustar el pH y luego de la gelificación a temperatura ambiente (24 hs). El escaneo se realizó tres veces en cada muestra a través de un colorímetro portátil MiniScan® EZ (Hunter Lab, Reston, VA, USA).

El índice de blanco (IB) de los geles se calculó con la siguiente fórmula (Paker y Matak, 2015):

$$\text{Índice de blanco} = 100-[(100-L)^2+a^2+b^2]^{1/2} \qquad \textbf{(2)}$$

Siendo L: luminosidad (escala de 0 a 100), a: intensidad del color rojo (escala de -60 a 60) y b: intensidad de color amarillo (escala de -60 a 60).

La diferencia de color antes y después de la gelificación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\Delta E = [\Delta L^2+\Delta a^2+\Delta b^2]^{1/2} \qquad \textbf{(3)}$$

Donde ΔL: es la diferencia de luminosidad después y antes de gelificar, Δa: es la diferencia de intensidad de color rojo después y antes de gelificar y b: es la diferencia de intensidad de color amarillo después y antes de gelificar.

Las determinaciones se realizaron por cuadriplicado.

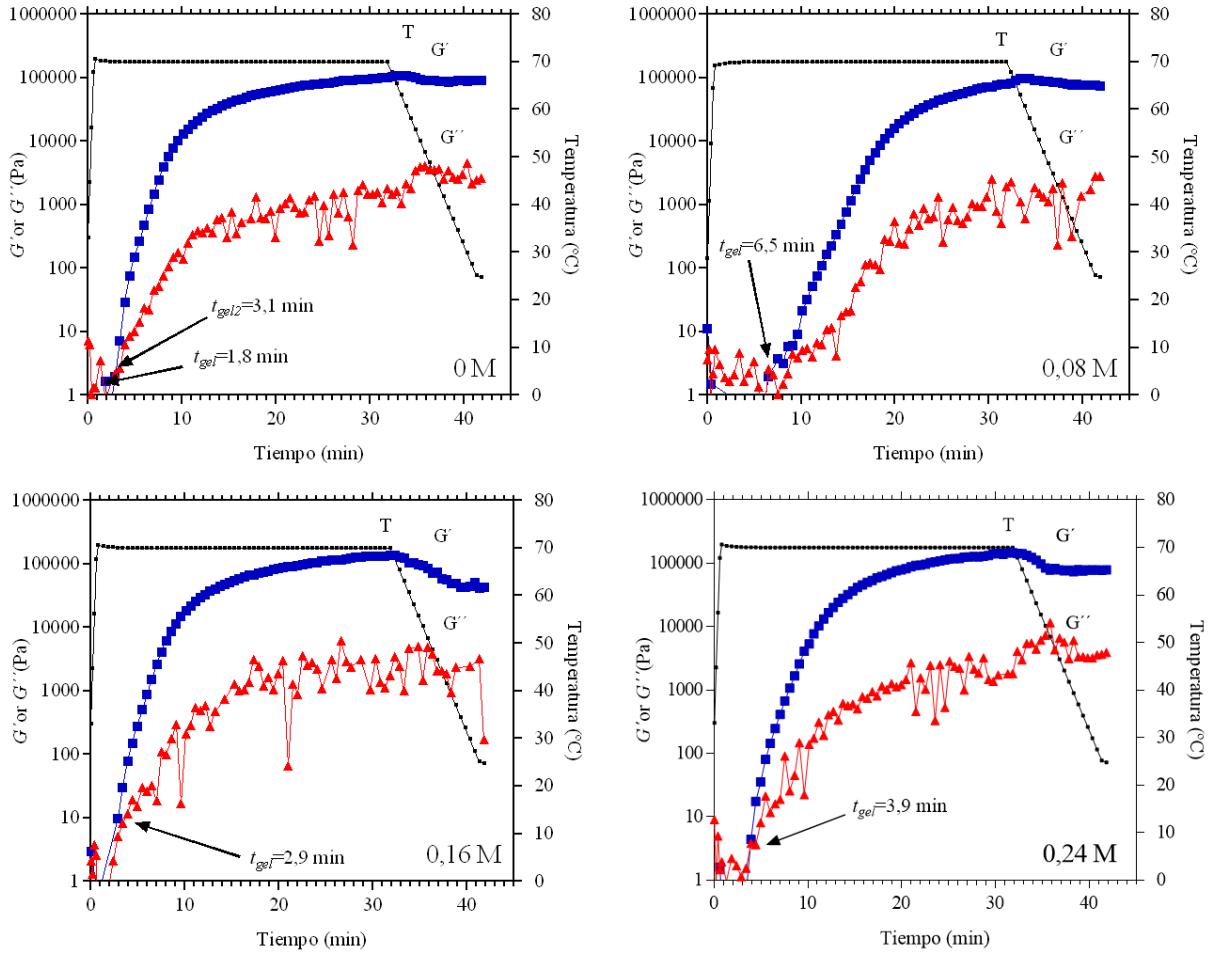


Figura 1. Evolución de G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) durante la gelificación de CMP (12%

p/p) y diferentes concentraciones de NaCl a pH 3,5 y 70ºC.

Textura de los geles

El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó a 25ºC en un Texture Analyzer (model TA-XT2i; Stable Microsystems, Godalming, UK) usando una zonda cilíndrica de ebonita (P/05 1,27 cm de diámetro). Las muestras se comprimieron al 20% de la altura inicial con una velocidad de compresión de 0,5 mm s^{-1}. Los diferentes parámetros texturales (dureza, resilencia, cohesividad y elasticidad) se obtuvieron con el software (Texture Expert Exceed). Los ensayos se realizaron por cuadriplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prims v6.0 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA), utilizando el test de Tukey.

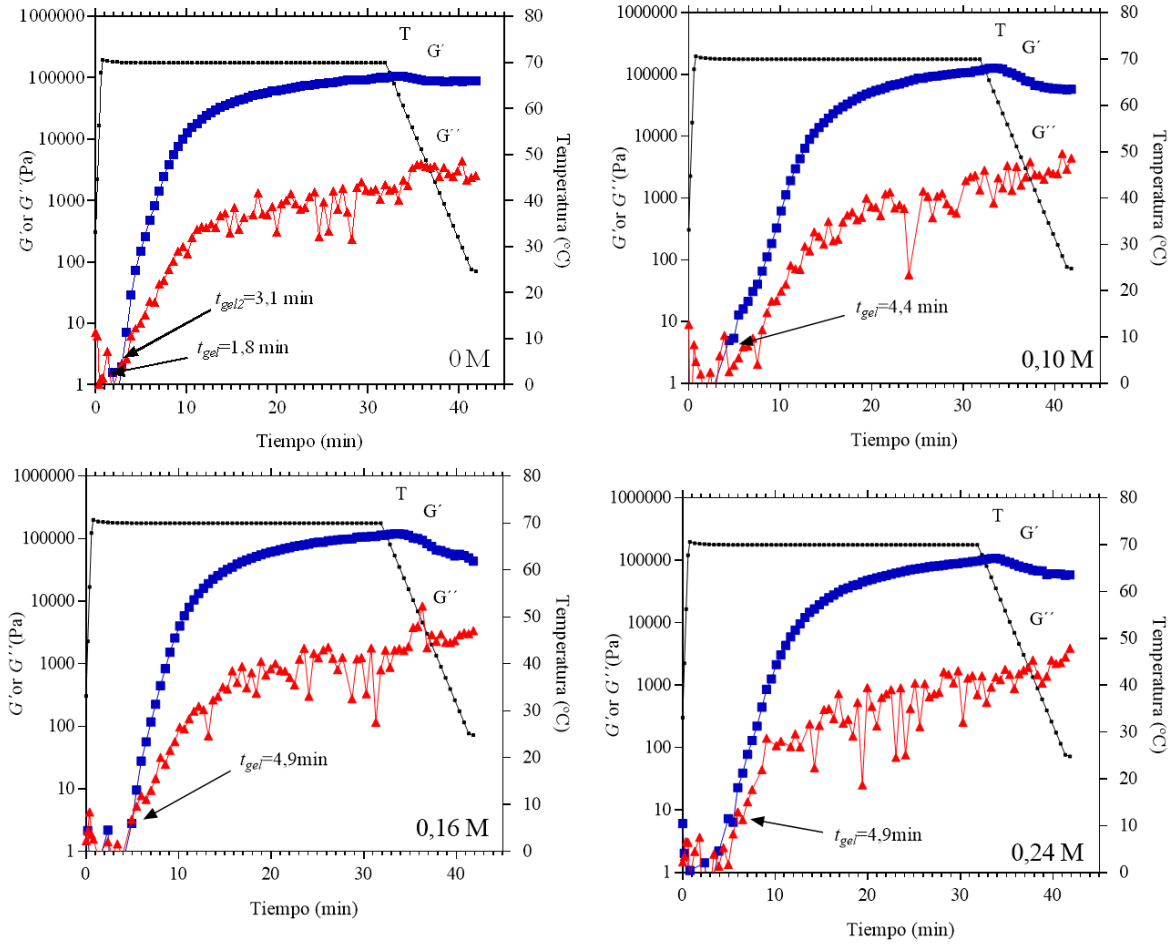


Figura 2. Evolución de G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) durante la gelificación de CMP (12% p/p) y diferentes concentraciones de $CaCl_2$ a pH 3,5 y 70ºC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La dinámica del proceso de gelificación del CMP en presencia de diferentes concentraciones de NaCl y $CaCl_2$ a pH 3,5 y 70ºC se muestra en las **Figuras 1** y **2**, respectivamente. Los módulos elástico (*G'*) y viscoso (*G''*) aumentaron con el tiempo de gelificación. El cruce de los módulos siempre se encontró en el periodo isotérmico (70ºC) y a partir de ese momento *G'* siempre fue superior a *G''*. En la condición de pH de

este trabajo (3,5), se evidencian dos fracciones principales en el CMP, que corresponderían a las formas glicosilada y no glicosilada (Thomä-Worringer et al., 2006). En trabajos anteriores se planteó un modelo para la gelificación del CMP en condiciones de baja fuerza iónica basado en dos etapas, consistente en una primera en la cual se forman dímeros por interacciones hidrofóbicas irreversibles y la segunda donde estos dímeros interaccionan a través de interacciones electrostáticas reversibles que finalmente gelifican dependiendo de la concentración a pH < 4,5 (Martinez et al., 2011). En las **Figuras 1 y 2 (0 M)** se muestra que la gelificación del CMP en condiciones de baja fuerza iónica presenta dos puntos de gel: el primero, t_{gel}, es el cruce de los dos módulos y el segundo, t_{gel2}, es un marcado ascenso de *G'*. El segundo punto de gelificación estaría relacionado a la gelificación de una segunda fracción (Farías et al., 2016; Martinez et al., 2011). El t_{gel}, obtenido por en el cruce entre *G' y G''*, fue 5 ± 1 min y no fue afectado por la presencia de NaCl o $CaCl_2$ ($p > 0,05$). En presencia de sales, el segundo punto de gel no se evidenció (**Figuras 1 y 2**). Se observó una ligera disminución en *G'* durante el enfriamiento cuando la concentración de las sales (NaCl o $CaCl_2$) superó la concentración 0,08 M. Los resultados mostraron que el módulo de almacenamiento al final del enfriamiento del CMP en ausencia de las sales fue 95,8 ± 7,4 kPa y no fue afectado por la presencia de NaCl o $CaCl_2$ ($p>0,5$).

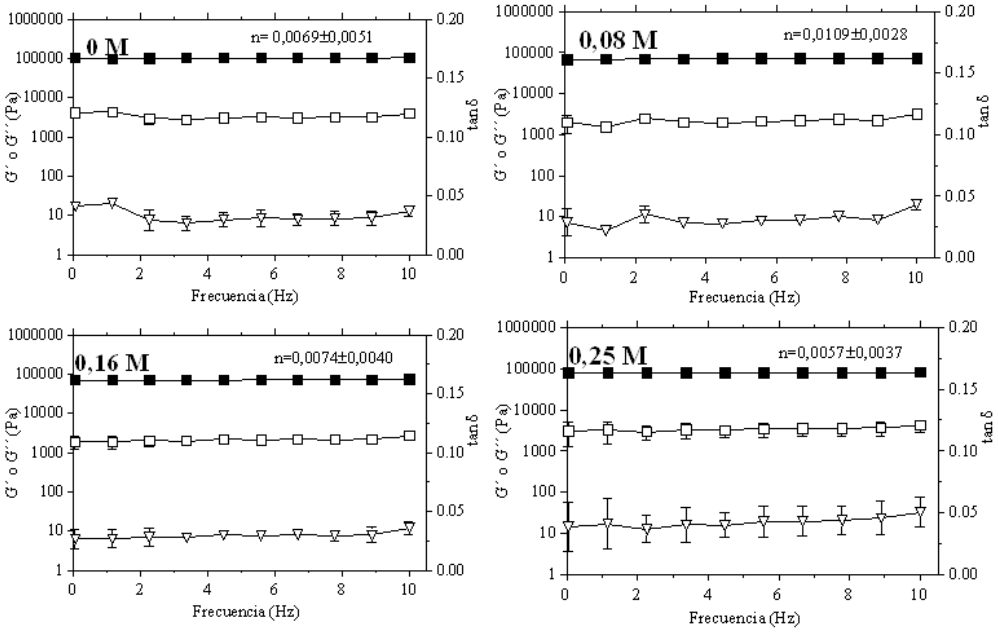


Figura 3. Barridos de frecuencia de geles de CMP (12% p/p) y diferentes concentraciones de NaCl a pH 3,5 y 25ºC. Los geles fueron formados a 70 ºC. G' (■), G'' (□) y tan □ (▽). Las barras representan el desvío estándar (n=2).

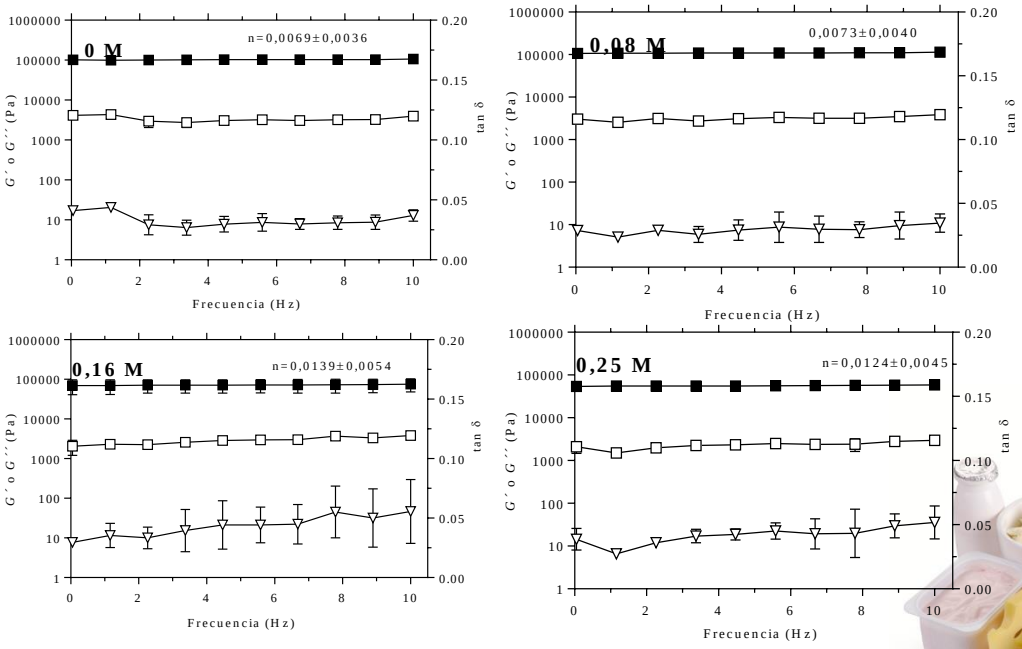


Figura 4. Barridos de frecuencia de geles de CMP (12% p/p) y diferentes concentraciones de $CaCl_2$ a pH 3,5 y 25ºC. Los geles fueron formados a 70 ºC. G' (■),G''(□) y tan □ (▽). Las barras representan el desvío estándar (n=2).

Las propiedades viscoelásticas de los geles de CMP se muestran en la **Figura 3 y 4 (0 M)**. Los barridos de frecuencia se caracterizaron porque ambos módulos, *G'* y *G''*, fueron independientes de la frecuencia de oscilación. Los módulos no se cruzaron en el rango de frecuencia estudiado, exhibiendo un comportamiento tipo gel fuerte (Ross-Murphy, 1995). Los valores de *tan* □□fueron menores a 0,05 en el intervalo de frecuencias, evidenciando la naturaleza elástica de los geles. En presencia de las sales, los barridos de frecuencia fueron similares a los obtenidos en condiciones de baja fuerza iónica (**Figuras 3 y 4**), no encontrándose diferencias en los valores de *G'*, *G''* y *tan* □.
La dependencia de *G´* con la frecuencia de oscilación se evaluó a través de la **Ecuación 1**, obteniéndose los correspondientes valores de n. Como puede apreciarse en ambas **Figuras 3 y 4**, fueron muy bajos (cercanos a 0) resaltando las características elásticas de los geles. La presencia de las sales tampoco afectó la dependencia de *G´* con la frecuencia, aún a altas concentraciones. Se considera que los valores bajos de *tan* □ y n se deben a que los geles son fuertemente elásticos (Baeza et al., 2003) y los resultados mostraron que esta elasticidad no fue afectada en ninguna medida por la presencia de sales.

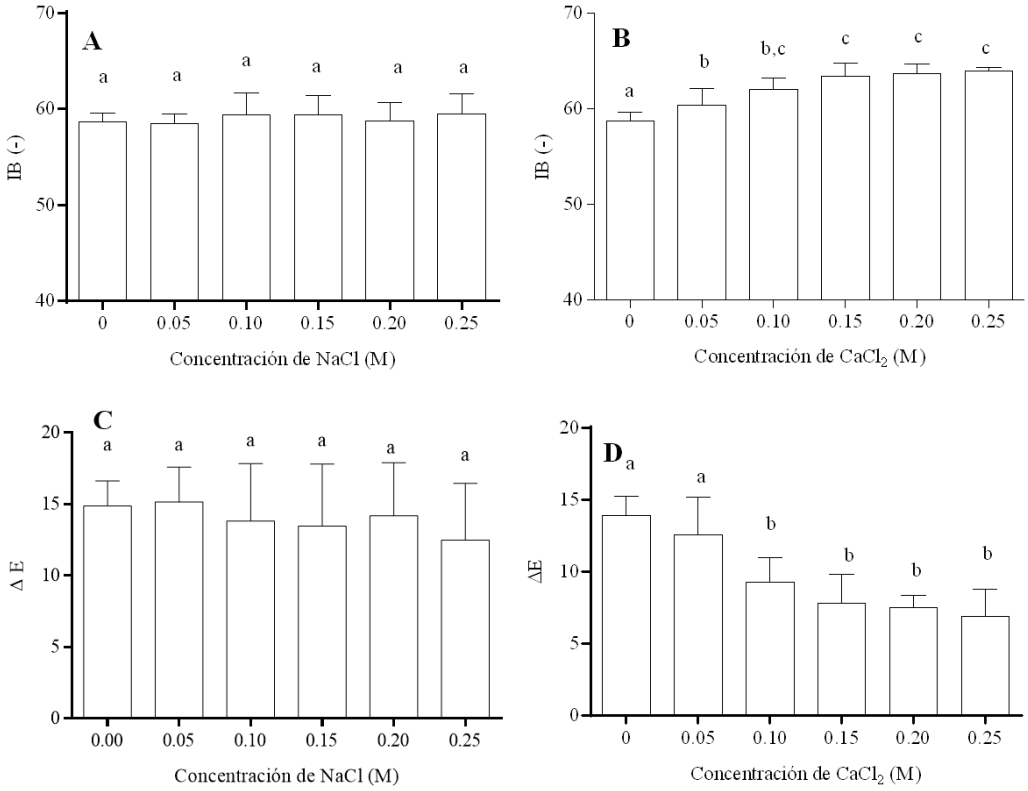


Figura 5. Color de geles de CMP al 12% (p/p) formados a 25ºC expresado como Blancura (A y B) y △E (C y D) en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (A y C) y $CaCl_2$ (B y D).

El CMP se autoensambla en el tiempo conduciendo finalmente a la gelificación si la concentración es lo suficientemente alta (Farías et al., 2010; Farias, 2012). Esto se evidencia por el cambio de coloración de los sistemas que comienzan transparentes y se vuelven opacos, quedando finalmente con un color similar a la leche. El cambio de color de los sistemas, medido a través de △E (**Ecuación 3**), se muestra en las **Figuras 5 C** y **D**. La presencia de NaCl no afectó el △E de los sistemas (**Figura 5 C**), sin embargo se observaron cambios en presencia de $CaCl_2$ (**Figura 5 D**). A partir de la incorporación de 0,10 M de $CaCl_2$, los △E fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$). Este efecto se debe a que los geles de CMP fueron en estos casos más transparentes. La transparencia del gel está relacionada con un menor tamaño de los agregados (Pilosof, 2000). En la misma **Figura 5** se presenta el Índice de Blanco (IB) de los geles de CMP obtenida a través de la **Ecuación 2**. No se encontraron diferencias significativas con respecto a este parámetro en presencia de NaCl (**Figura 5 A**). Sin embargo, a partir de 0,05 M de $CaCl_2$ se determinó un cambio en los parámetros del IB, siendo la coloración idéntica a partir de 0,10 M, coincidiendo visualmente con la transparencia de los geles.

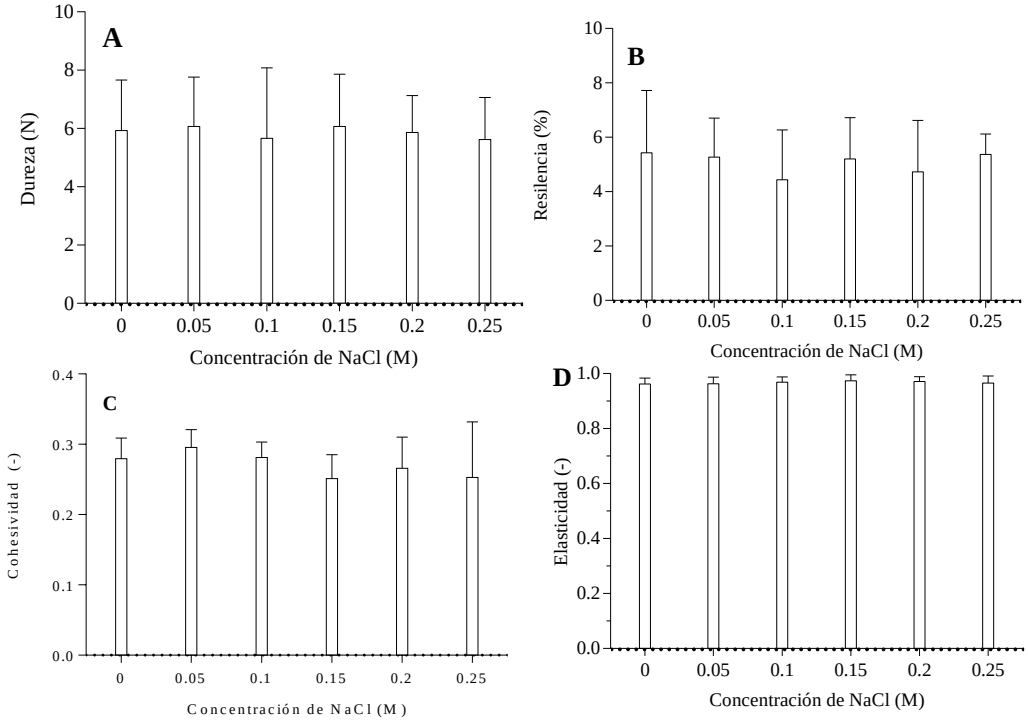


Figura 6. Parámetros de textura A) dureza, B) resilencia, C) cohesividad y D) elasticidad de geles de CMP 12% (p/p) a diferentes concentraciones de NaCl formados a 25ºC.

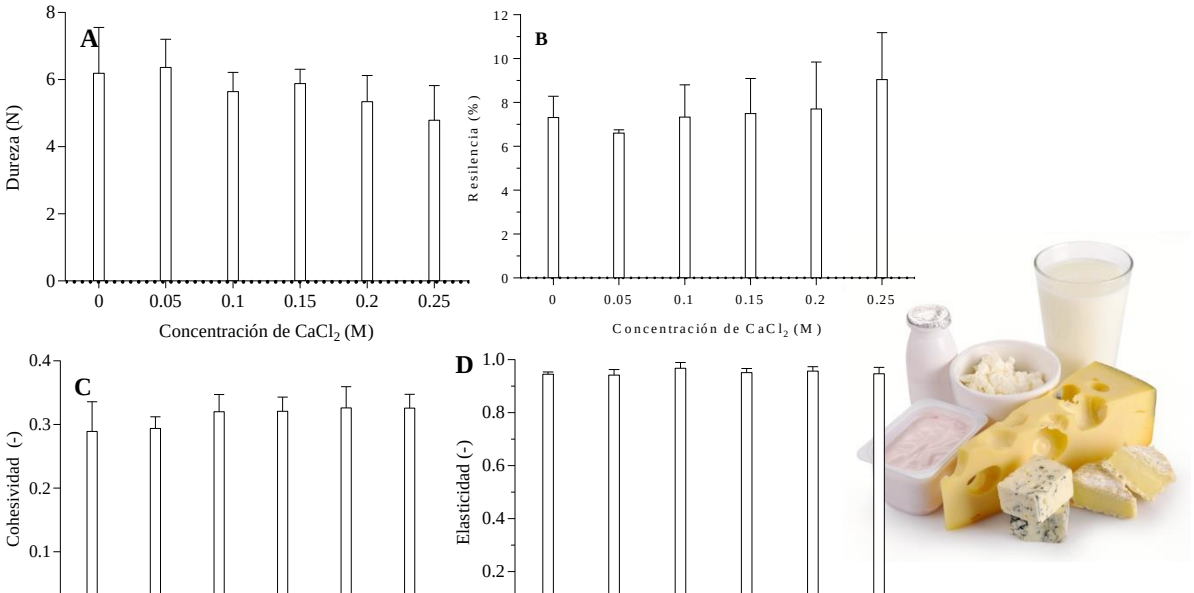


Figura 7. Parámetros de textura A) dureza, B) resilencia, C) cohesividad y D) elasticidad de geles de CMP 12% (p/p) a diferentes concentraciones de $CaCl_2$ formados a 25ºC.

Las propiedades texturales de los geles se presentan en las **Figuras 6 y 7**. No se observaron cambios en los parámetros texturales evaluados en presencia de las sales. Los geles formados sin sales presentaron una dureza de 6,2 ± 1,4 N; una adhesividad de -3,4 ± 0,7 J (datos no mostrados); un porcentaje de resilencia de 5,7 ± 0,6 %; una cohesión de 0,29 ± 0,05 y una elasticidad de 0,95 ± 0,01. Los valores de cohesividad y resilencia fueron muy bajos, mostrando que no son autosoportables y con poca capacidad de recuperación. Sin embargo, la elasticidad fue alta. Estos resultados coincidieron con los encontrados anteriormente (Farías et al., 2016) para geles de CMP acidificados a pH 3,5 con ácidos clorhídrico y cítrico.

CONCLUSIONES

Se concluye que las sales no afectaron las propiedades de gelificación y texturales del CMP. Sin embargo, el cambio de color de los geles en presencia de $CaCl_2$ evidenció agregados de tamaño más pequeño.

BIBLIOGRAFÍA

Baeza, R., Gugliotta Luis M. y Pilosof A. M. R. (2003). Gelation of β-lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 31(1-4), 81-93.

Farías, M. E., Martinez M. J. y Pilosof A. M. R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. International Dairy Journal., 20, 79–88.

Farías, M. E. y Pilosof A. M. R. (2009). Influencia del pH y la concentración en la gelificación del caseinoglicomacropéptido. Trabajos completos del III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Tomo IV. Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales, 133- 139.

Farías, M. E. y Pilosof A. M. R. (2014). Influencia de las sales en las nanoestructuras de CMP. Revista Tecnología y Ciencia, 12 Nº 24 Mayo 2014, 193-200.

Farías, M. E. y Pilosof A. M. R. (2016). The influence of acid type on self-assembly, rheological and textural properties of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 55, 17-25.

Farias, María Edith. (2012). Autoensamblaje del caseinomacropéptido (CMP) y su impacto en la gelificación y espumado. Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Fernando, Susil Francis y Woonton Brad William. (2010). Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid

in bovine glycomacropeptide (GMP). Journal of Food Composition and Analysis, 23(4), 359-366.
Martinez, M. J., Farías M. E. y Pilosof A. M. R. (2010). The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide - b-lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. International Dairy Journal, 20(9), 580-588.
Martinez, M. J., Farías M. E. y Pilosof A. M. R. (2011). Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. Food Hydrocolloids, 25(5), 860-867.
Paker, Ilgin y Matak Kristen E. (2015). Impact of sarcoplasmic proteins on texture and color of silver carp and Alaska Pollock protein gels. LWT - Food Science and Technology, 63(2), 985-991.
Pilosof, A. M. R. . (2000). Gelificación. In G. B. B. A. M. R. Pilosof (Ed.), *Caracterización funcional y estructural de proteínas (pp. 75-95)*). Eudeba. Buenos Aires, Argentina. .
Ross-Murphy, Simon B. (1995). Rheological characterisation of gels. Journal of Texture Studies, 26(4), 391-400.
Stading, Mats y Hermansson Anne-Marie. (1990). Viscoelastic behaviour of b-lactoglobulin gel structures. Food Hydrocolloids, 4(2), 121-135.
Thöma-Worringer, C., Sørensen J. y López-Fandiño R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 16, 1324–1333.
Thomä-Worringer, C., Sørensen John y López-Fandiño Rosina. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 16(11), 1324-1333.
von Staszewski, Mariana, Jara Federico L., Ruiz Ana L. T. G., Jagus Rosa J., Carvalho Joao E. yPilosof Ana M. R. (2012). Nanocomplex formation between b-lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. Journal of Functional Foods, 4(4), 800-809.

AGRADECIMIENTOS
A los Departamentos de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (Proyecto PICT-2014-1402), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) y al ITAPROQ-CONICET.

Influencia de la cantidad de yerba y la temperatura del agua sobre las preferencias del consumidor de mate caliente

Lovera N. [1,2], Alegre A.[1], Capellari S.[1], Surkan S.[1], Schmalko M.[1,2]

(1) Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.
(2) Instituto de Materiales de Misiones, CONICET, Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.
mesh@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

El mate caliente constituye la forma de consumo más frecuente de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire). La temperatura con la que se introduce la infusión en la boca depende de variables tales como la temperatura del agua de cebado, el material del mate, la cantidad de yerba en el recipiente y de la frecuencia de cebado. El objetivo de este trabajo fue determinar las preferencias de los consumidores habituales cuando se combinan estas variables. Los resultados indicaron que tanto la cantidad de yerba en el recipiente como la temperatura del agua en el termo tuvieron influencia significativa sobre la percepción del evaluador de la temperatura óptima de consumo. En el caso de la cantidad de yerba la calificación de menor temperatura percibida fue asignada a la mayor cantidad de yerba en el recipiente, y no hubo diferencia significativa entre las cantidades 30 y 40 gramos. Los evaluadores no pudieron encontrar la influencia de la cantidad de yerba utilizada cuando las temperaturas del agua del termo fueron altas (80°C y 90°C). La mejor calificación se obtuvo cuando se utilizó agua a 80ºC en el termo y 40 g de yerba mate en el recipiente.

Palabras clave: Yerba mate, análisis sensorial, temperatura.

ABSTRACT

Hot mate is the most common form of consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire). The temperature at which the infusion is introduced in the mouth depends on different variables such as water temperature, container material, solid quantity in the vessel and consumption frequency. The aim of this study was the determination of the amount of yerba and water temperature preferred by consumers of hot mate. Results indicated that amount of yerba in the container and the water temperature had significant influence on the infusion temperature perceived by the panelist. In the case of the amount of yerba the lowest score (low perceived temperature) was assigned to the largest amount of yerba, and no significant difference was found between the amounts 30 and 40 g. The panelist could not distinguish the amount of yerba used when water temperatures were high (80°C and 90°C). Panelists assigned as suitable water temperature of 80°C and the amount of 40 g of yerba mate in the vessel.

Keywords: Yerba mate, sensorial analysis, temperature.

INTRODUCCIÓN

La Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) es una planta de la región central del MERCOSUR (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay). De sus hojas y ramas se elabora una infusión caliente conocida popularmente como “el mate” muy consumida en Argentina, Paraguay, Uruguay y la región sur del Brasil, donde el consumo anual por habitante es de 6-8 kg. El proceso industrial de elaboración consiste en una primera etapa de tratamiento térmico para inactivar las enzimas que producen el pardeamiento. En una etapa siguiente el material es secado en secaderos de cinta con flujo cruzado de aire o gases de combustión que se encuentran entre 80 y 120ºC (Schmalko et al., 2007) hasta un contenido de humedad de entre 3 y 5%. Posteriormente el material es sometido a una molienda con el objeto de reducir su volumen. En Brasil, el

producto es consumido en estas condiciones; mientras que en Argentina y Paraguay es sometido a un proceso de estacionamiento, que varía entre 30 y 300 días, en el cual el producto adquiere otro sabor (Holowaty *et al*. 2016). En los últimos años, además de sus propiedades nutricionales (Ramallo *et al*. 1998), se han encontrado propiedades funcionales, debido principalmente a la presencia de polifenoles (8-10%), cafeína y otros xantinas (0,8 -l 2%) y saponinas (0,3-0,5%) (Calviño *et al*. 2005, Bravo *et al.* 2007, Bastos et al. 2006; Hartwig *et al*. 2013). Tradicionalmente se consume como mate caliente (utilizándose agua entre 65 y 95ºC), aunque en los meses de verano y principalmente en el Paraguay, se consume utilizándose agua fría (entre 5 y 20ºC).

El consumo de alimentos y bebidas calientes siempre tuvo cuestionamientos por parte de la IARC (International Agency for Research on Cancer) de la Organización Mundial de la Salud, debido a que se consideran potencialmente riesgosas para el desarrollo de cáncer, principalmente de esófago. En el año 2016, se realiza una revisión sobre el consumo de café y mate caliente (Monograph 116 de la IARC) y se llega a la conclusión que el mate muy caliente puede ser potencialmente cancerígena (Grupo 2A) si es consumido a una temperatura por encima de 65ºC, mientras que el mate no muy caliente fue clasificado como "no carcinogénico a los humanos" (Grupo 3). Borchgrevink *et al*. (1999) y Brown y Diller (2008) realizaron estudios referentes a las temperaturas de consumo de café y las preferencias de los consumidores, encontrando que los consumidores prefieren las temperaturas relativamente elevadas (62,8 a 68,3ºC). En té Wu *et al*. (2009), Islami *et al*. (2008 and 2009) encontraron que las temperaturas de consumo fueron superiores 65 ºC, clasificándose en tres grupos: tibio (< 65ºC), caliente (65-69ºC) y muy caliente (>= 70ºC). En los dos casos (café y té) la bebida se servía en tazas y se medía la temperatura de la infusión en la taza. La temperatura a la que se calienta el agua para ser utilizada en el mate, varía entre 65 y 95ºC (Pagliosa et al. 2009, Santa Cruz *et al*. 2002). La forma habitual de consumo del mate es muy variable, ya que se utilizan recipientes de diferentes materiales (madera, calabaza, cerámica, vidrio y metal), cantidades diferentes de yerba mate (entre 20 y 100 g), diferentes tipos de bombilla (generalmente de metal) y diferentes temperaturas del agua (entre 65 y 95 ºC). Hasta el momento no existen publicaciones que consideren estas variables, por lo que resulta necesario un estudio de análisis sensorial respecto a la relación que existe entre estas variables y la temperatura de consumo de la infusión. El objetivo de este trabajo fue determinar la cantidad de yerba y la temperatura del agua de cebado preferidos por los consumidores habituales de mate caliente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Encuesta

Se realizó una encuesta electrónica mediante Internet (formulario Google) con el fin de recabar información sobre el consumo del mate: la frecuencia del consumo, cantidad de yerba utilizada en el recipiente, material y tamaño del mismo, tipo de bombilla utilizada, preferencia de la temperatura y como se acostumbra realizar la primera cebada. La condición para participar en la encuesta fue que sean consumidores habituales de mate. La encuesta fue realizada sobre un total de 359 personas de distintas edades (entre 19 y 73 años), hombres y mujeres. En base a los resultados de las encuestas se determinaron las variables y los niveles de ser utilizados en la evaluación sensorial. Asimismo se utilizó la misma encuesta para el reclutamiento de consumidores habituales de mate que participaron en los paneles sensoriales.

Evaluación sensorial

Influencia de la cantidad de yerba y de la temperatura del agua

Con la finalidad de evaluar la influencia de la cantidad de yerba y de la temperatura del agua de cebado sobre las preferencias de los consumidores, se llevaron a cabo cuatro paneles sensoriales con 37-39 consumidores habituales de mate caliente, en un área con cabinas individuales desarrolladas para tal fin con una temperatura ambiente de 27±1ºC. A cada evaluador se le entregó tres recipientes de porcelana (enumerados y ordenados en forma aleatoria) con yerba, bombillas de acero inoxidable, un termo con agua caliente y una planilla de evaluación sensorial. Los recipientes fueron cubiertos con papel (**Figura 1**) con la finalidad de que la percepción visual del panelista no incida sobre los resultados. Se les solicitó evaluar cada muestra siguiendo el procedimiento detallado en la planilla de evaluación sensorial y macar su percepción global de

la temperatura en una escala hedónica de 5 puntos (1. Frío, 2. Tibio, 3. Adecuado, 4. Caliente, 5. Muy caliente), el atributo que se le solicitó analizar fue "temperatura del extracto" (**Figura 2**). Se llevaron a cabo ensayos con 30, 40 y 50 g de yerba, temperaturas del agua del termo de 70, 80 y 90ºC y una frecuencia de cebado 1 min.

Figura 1. Presentación de muestras de mate

Nombre:……..……..…… Edad:…… Fecha:…….

A continuación se entregan tres muestras de yerba mate. Evalúe cada muestra comenzando por la de la izquierda siguiendo el procedimiento detallado.

a) Moje toda la yerba con el agua del termo.
b) Succione el extracto como lo consume de manera habitual.
c) Espere 60 segundos (1 minuto).
d) Repita la operación anterior (sin mojar toda la yerba).
e) Cebe 3 veces más, es decir 4 cebadas en total por muestra de yerba.
f) Evalúe el atributo "temperatura del extracto" y marque con una **X** en la tabla a continuación su percepción.

Percepción / Muestra	Frío	Tibio	Adecuado	Caliente	Muy caliente
752					
325					
479					

Comentarios:……
……...……..

Figura 2. Planilla de influencia de la cantidad de yerba y la temperatura del agua de cebado

Influencia del material de mate

Con el propósito de evaluar la influencia del material del mate sobre las preferencias de los consumidores, acerca de la temperatura del extracto del mate, se llevó a cabo un panel sensorial con 20 consumidores habituales de mate caliente, en un área provista de cabinas individuales a una temperatura ambiente de

27±1ºC. A cada evaluador se le entregaron cinco mates de distintos materiales (porcelana, metal, madera, vidrio y calabaza) con yerba y bombillas de acero inoxidable y un termo con agua (**Figura 3**). Se utilizaron 40 g de yerba en el mate y una temperatura de 80ºC en el agua del termo (de acuerdo a los resultados obtenidos los ensayos anteriores). A cada evaluador se le presentó una planilla de evaluación sensorial similar a la del ensayo anterior (**Figura 2**), los panelistas siguieron el mismo protocolo de evaluación del ensayo anterior pero en este caso analizaron 5 muestras.

Figura 3. Muestras de mate de diferentes materiales

Influencia de la frecuencia de cebado

Para evaluar la influencia de la frecuencia de cebado sobre las preferencias de los consumidores, acerca de la temperatura del extracto del mate, se llevó a cabo un panel sensorial con 9 consumidores habituales de mate caliente, a una temperatura ambiente de 27±1ºC. En este caso a cada evaluador se le entregó tres mates de porcelana con yerba (40g) y bombillas de acero inoxidable y un termo con agua (80ºC). Se les solicitó seguir el procedimiento descripto en la planilla de evaluación sensorial (**Figura 4**), cebando cada 0,5, 1 y 2 min en el primer, segundo y tercer mate, respectivamente, y marcar su percepción respecto a la "temperatura del extracto".

Nombre:……..……..……..… Edad:……...…… Fecha:……

A continuación se entregan tres muestras de yerba mate. Evalúe cada muestra comenzando por la de la izquierda siguiendo el procedimiento detallado.

a) Moje toda la yerba con el agua del termo.
b) Succione el extracto como lo consume de manera habitual.
c) Espere 30 segundos en la primer muestra, 1 minutos en la segunda y 2 minutos en la tercera.
d) Repita la operación anterior cebando la cantidad que acostumbra (Cebe 3 mates en total por cada muestra).
e) Evalúe el atributo "temperatura del extracto" y marque con una **X** en la tabla a continuación su percepción.

Percepción / Muestra	Frío	Tibio	Adecuado	Caliente	Muy caliente
1					
2					
3					

Comentarios:……..……
……..

Figura 4. Planilla de influencia de la frecuencia de cebado

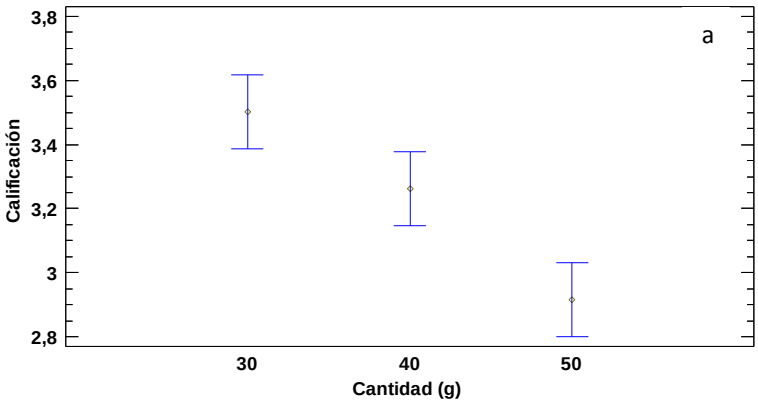
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Encuesta

Los resultados de la encuesta realizada sobre una población de 359 consumidores habituales de mate indicaron porcentajes similares (31, 30 y 32%) para las opciones: una vez por día, dos veces al día, y más de dos veces al día respecto de la frecuencia de consumo del mate caliente. La mayoría de los consumidores (81%) prefirió tamaños de mates medianos indicando que realizan la carga de la yerba hasta tres cuartos del recipiente (69%). Los materiales de mate preferidos por los consumidores fueron madera (21%) y calabaza (20%) seguidos por sus variantes revestidos con cuero (19%) y metal (12%). Sin embargo, los materiales indicados como más utilizados fueron madera (19 %), seguido por el de madera revestida con metal (18%), el de calabaza revestida con cuero (16%) y el de calabaza sin revestimiento (14%). Los materiales menos utilizados y preferidos fueron los de metal, vidrio, porcelana y metal revestido con cuero. A la hora de elegir la bombilla para el mate la mayoría de los consumidores prefirió las de alpaca (58%), mientras que el 33% indicó que utiliza bombillas de acero inoxidable. El agua caliente se obtiene principalmente con pava (44%) y jarra eléctrica (38%) y se mantiene en termos (97%). La temperatura preferida del agua de cebado fue caliente (80-90ºC), con el 59% y luego moderada (70-80ºC) con un 36%. Para comenzar el mate, un 66% prefiere hacerlo con agua tibia, un 16% con agua fría y un 17% con agua caliente (directamente del termo). Asimismo se encontró que la infusión se consume principalmente compartida por dos personas (46%) o solo (30%).

Evaluación sensorial

La temperatura del agua de cebado y la cantidad de yerba utilizada en el recipiente influyeron sobre la percepción de la temperatura por parte de los panelistas. Con los datos obtenidos de la evaluación sensorial de 38 consumidores entrenados se realizó un análisis de varianza multifactorial donde se encontró que ambos factores, cantidad de yerba y temperatura del agua, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la calificación de percepción registrada por los evaluadores con un nivel de confianza del 95,0% (**Figura 5**). La calificación que asignan los evaluadores a la temperatura del extracto disminuye cuando se incrementa la cantidad de yerba en el recipiente y como era de esperarse aumenta al aumentar la temperatura del agua de cebado. Los niveles óptimos para la calificación 3 (Adecuado) fueron de un rango de 40 - 50 g de yerba mate y un rango da temperatura de 70 – 80ºC.



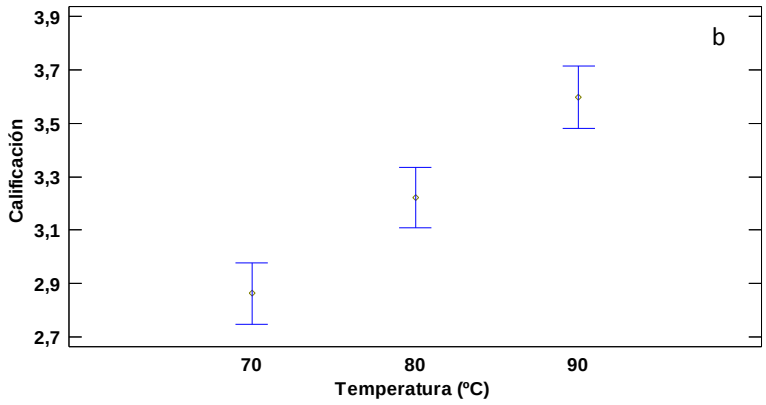


Figura 5. Calificación obtenida en la evaluación sensorial (1. Frío, 2. Tibio, 3. Adecuado, 4. Caliente, 5. Muy caliente) en función de la cantidad de yerba (a) y la temperatura del agua (b)

En el gráfico de interacción (**Figura 6**) se puede observar que los evaluadores calificaron con valores cercanos a 3 (Adecuado) a las siguientes combinaciones: 1) 30 g y 70ºC, 2) 40 g y 70ºC y 3) 40 g y 80ºC. Estas tres combinaciones fueron las óptimas preferidas por los consumidores habituales de mate caliente.
En base a estos resultados, se seleccionó la combinación de 40 g y 80ºC (los valores medios de ambas variables) para realizar los ensayos de la influencia del material del mate y de la frecuencia de cebado.

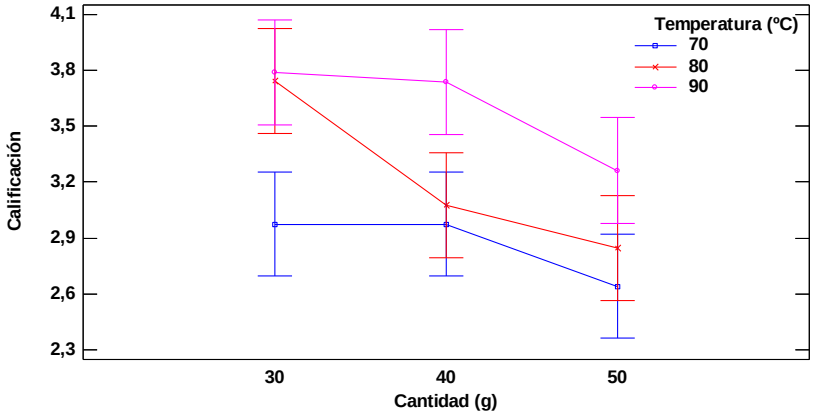


Figura 6. Gráfico de interacción entre la cantidad de yerba y la temperatura del agua para la calificación obtenida en la evaluación sensorial (1. Frío, 2. Tibio, 3. Adecuado, 4. Caliente, 5. Muy caliente)

En cuanto a los ensayos realizados con el objetivo de evaluar la influencia del material del mate sobre la percepción de la temperatura del extracto, los resultados indicaron que no existen diferencias significativas ($p<0,5$) en las puntuaciones indicadas por los evaluadores que se pueda atribuir al material del mate. Las puntuaciones medias de los evaluadores fueron cercanos al valor de 3 (adecuado) de la escala hedónica (entre 2,90 y 3,55) para todos los materiales analizados. De los ensayos destinados a evaluar la influencia de la frecuencia de cebado se encontró que la puntuación de la "temperatura del extracto" asignada por los consumidores no presentó diferencia significativa ($p>0,5$).

CONCLUSIONES

La mayoría de los consumidores habituales de mate caliente prefiere tamaños de mates medianos, cargando la yerba hasta tres cuartos del recipiente. El material preferido del mate fue la madera y la alpaca para la

bombilla. El rango de la temperatura preferida del agua fue de 80-90ºC. Al realizar experiencias de análisis sensorial en consumidores frecuentes de mate respecto a la temperatura adecuada del agua y la cantidad de yerba mate utilizada, se encontraron tres combinaciones: 1) 30 g y 70ºC, 2) 40 g y 70ºC y 3) 40 g y 80ºC. Al evaluar la influencia del material del mate y la frecuencia de cebado sobre la puntuación dada por los evaluadores, se encontró que ninguna de estas dos variables influía en la misma.

BIBLIOGRAFÍA

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EAFS. 2006. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of Yerba Mate (Ilex paraguariensis) leaves. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49: 399–404.

Borchgrevink CP, Susskind AM, Tarras JM. 1999. Consumers preferred hot beverages temperatures. Food Quality and Preference, 10: 117-121.

Bravo L, Goya L, Lecumberri E. 2017. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. Food Research International, 40: 393–405.

Brown F, Diller, KR. 2008. Calculating the optimum temperature for serving hot beverages. Burns, 34: 648-654.

Calviño AM, Tamasi OP, Ciappini, MC. 2005. Caffeine Content and Dynamical Bitterness of Yerba Mate Ilex paraguariensis Infusions. Food Science and Technology International, 11:401–407.

Hartwig VG, Schmalko ME, Alzamora, SM, Brumovsky LA. 2013. Optimization of the extraction of antioxidants and caffeine from maté (Ilex paraguariensis) leaves by response surface methodology. International Journal of Food Studies, 2: 69-80.

Holowaty SA, Trela, V; Thea, AE., Scipioni, G.P., Schmalko, M.E. 2016. Yerba maté (Ilex paraguariensis St. Hil): Chemical and Physical changes under different aging conditions. Journal of Food Process Engineering, 39: 19-30 (2016).

Islami F; Pourshams A., Dariush Nasrollahzadeh, D, Kamangar F., Fahimi S, Shakeri R, Abedi-Ardekani B, Merat S, Vahedi, H, Shahryar Semnani S, Abnet C, Brennan P, Møller H, Farrokh Saidi F, Dawsey SM, Malekzadeh R. 2008. Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study. BMJ | ONLINE FIRST | bmj.com: 1-8

Islami F, Boffetta P, Ren JS, Pedoeim L, Khatib D, Kamangar F. 2009. High-temperature beverages and foods and Esophageal cancer risk- A systematic review. International Journal of Cancer, 125: 491–524.

Pagliosa CM, Pereira SM, Vieira, MA, Costa LA, Teixeira E, De MC Amboni RD, Amante ER.2009. Bitterness in Yerba Mate (Ilex paraguariensis) leaves. Journal of Sensory Studies, 24: 415-426.

Ramallo LA, Smorczewski M, Valdez EC, Paredes AM, Schmalko ME. 1998. Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate en tres formas diferentes de consumo. La Alimentación Latinoamericana, 225: 48-52.

Santa Cruz MJ, Gartta, Hough G. 2002. Sensory Descriptive Analysis of Yerba Mate (Ilex paraguariensis Saint Hilaire), a South American Beverage. Food Science and Technology International, 8: 25-31

Schmalko ME, Peralta JM, Alzamora, SM. 2007. Modeling the Drying of a Deep-bed of Ilex paraguariensis in an Industrial Belt Conveyor Dryer. Revista Drying Technology, 25: 1967-1975.

Wu M, Liu M, Kampman E, Zhang ZF, Van't Veer P, Wu DL, Wang, PH, Yang J, Qin Y, Mu, LN, Kok FJ, Zhao JK. 2009. Green tea drinking, high tea temperature and esophageal cancer in high- and low-risk areas of Jiangsu Province, China: A population-based case–control study. International Journal of Cancer, 124: 1907–1913.

Caracterización de una bebida a base de almendras (*Prunus dulcis*): propiedades fisicoquímicas y microbiológicas y estimación de vida útil.

Montenegro, M.[(1)], Carrizo Flores, R. [(1)], Grzona, M. [(1)], Comelli, N. [(1)], Ponzi, M. [(1)]

(1) F.I.C.A. (U.N.S.L.), Ruta Prov. Nº55 (Extremo Norte), Villa Mercedes, San Luis, Argentina
maritamontenegro@gmail.com

RESUMEN

Los problemas asociados a obesidad, colesterol e intolerancia a la lactosa han llevado a una creciente demanda por las bebidas vegetales. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de una bebida a base de almendras (*Prunus dulcis*) a partir de los frutos macerados y triturados en agua purificada, el análisis microbiológico de muestras crudas y con tratamiento térmico suave, el análisis de sus propiedades fisicoquímicas, y estudio de vida útil en dos ambientes diferentes de almacenamiento. Estos estudios son de utilidad, para conocer la calidad microbiológica, las propiedades reológicas, y las diferencias de comportamiento cuando fueron tratadas térmicamente y envasadas en recipientes estériles bajo condiciones diferentes de almacenamiento. De los análisis realizados se encontró diferencias en los recuentos de bacterias lácticas y levaduras y estudios de vida útil entre las muestras pasteurizadas y crudas almacenadas bajo diferentes condiciones. Estos estudios son fundamentales para un posterior desarrollo de un alimento con características saludables, natural, que utilizará como matriz a esta bebida vegetal a base de almendras y será adicionada con bacterias lácticas probióticas y agregado de extracto concentrado de Topinambur (*Helianthus tuberosus)* rico en fructooligosacáridos (FOS), especialmente inulina, como prebiótico.

Palabras Clave: Alimentos funcionales, bebidas vegetales, almendras, prebióticos

ABSTRACT

The problems associated with obesity, cholesterol and lactose intolerance have led to an increasing demand for vegetable beverage. The aim of this study was to obtain a beverage made from almonds *(Prunus dulcis)* from macerated and crushed fruits in pure water. Microbiological analysis of raw samples and mild heat treatment, analysis of their physicochemical properties, and study of shelf life in two different storage environments were carried out. These studies are useful to know the microbiological quality, rheological properties, and behavior differences when they were heated and packaged in different storage conditions. Differences in bacteria counts and shelf life were observed between raw and heated samples and different packaging conditions. These studies are essential for a further development of a fermented meal with health and natural features, using our beverage as a matrix. This beverage will be supplemented with probiotic lactic acid bacteria and a concentrated extract of Jerusalem's artichoke (*Helianthus tuberosus*) rich in fructooligosaccharides (FOS), inulin especially, as a prebiotic.

Keywords: Functional foods, vegetable drinks, almonds, prebiotics.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la prevalencia de los problemas de salud pública relacionados con el estilo de vida sedentario ha sido ampliamente discutida en los países desarrollados. El consumo de alimentos funcionales está aumentando rápidamente por la concientización de la población entre dieta y salud. Los alimentos funcionales proveen beneficios más allá de nutrición básica y pueden jugar un importante rol en reducir o minimizar los riesgos de ciertas enfermedades y otras condiciones de salud (Pinto et al. 2012), aportan beneficios más allá de la nutrición básica y juegan un rol importante en la reducción o minimización de riesgos de ciertas enfermedades.

Los problemas asociados a obesidad, colesterol e intolerancia a la lactosa han llevado a una creciente demanda por las bebidas vegetales. Los factores relacionados con el estilo de vida como la falta de actividad física, tabaquismo, dietas inapropiadas altamente calóricas, unidas a los factores hereditarios, son los factores de riesgo clave en estas enfermedades. Adicionalmente, como la esperanza de vida ha aumentado, el bienestar de la población envejecida es otro de los objetivos.

De este modo, la dieta es uno de los factores que pueden ser mejorados para disminuir los factores de riesgo de enfermedades relacionados con la alimentación. Por otro lado, será responsabilidad de la industria alimenticia proporcionar productos apropiados para los consumidores y de cómo comunicar sus beneficios. El desafío de los consumidores será construir una dieta con los productos disponibles en el mercado (Bhaskaran y Hardley 2002). El negocio de las bebidas tiene un gran potencial para futuros desarrollos, centrado en los deseos del consumidor (Osborn et al. 2003). Tanto los consumidores como la industria están buscando productos innovadores y actualmente las bebidas de soja, almendra, y de arroz están ayudando a llenar el vacío entre leche y cereales (Rojas 2012).

Hay una amplia variedad de bebidas vegetales, entre ellas la derivada de las almendras *(Prunus dulcis)*. Estas bebidas son emulsiones donde la grasa de los granos se dispersa en una fase acuosa y donde el resto de los componentes juegan diferentes roles en la estabilidad del producto. Estas emulsiones tienen niveles elevados de calcio, fósforo y potasio y bajo contenido en sodio.

Las almendras son ricas en ácidos grasos mono y poliinsaturados, proteínas vegetales, fibra dietaría, fitosteroles, polifenoles, vitaminas y minerales. Tiene una alta relación K/Na y los carbohidratos presentes tienen un bajo índice glucémico, haciéndola apta para los diabéticos, y una relación balanceada de Ca/P, haciéndola apta como alternativa a la leche de vaca, y saludable para personas con problemas cardíacos. Se considera que mantiene el colesterol a niveles óptimos debido a su elevado contenido de componentes antioxidantes que contribuyen a la prevención de enfermedades coronarias (Fraser et al. 2002; Jenkins et al. 2008; Kris et al. 2008; Tey et al. 2011).

Existen estudios previos sobre la optimización en la elaboración de esta bebida a base de almendras, y el efecto de los tratamientos térmicos y la presión de homogeneización sobre su estabilidad y las propiedades físicas. La combinación de tratamientos térmicos suaves con altas presiones de homogeneización mejora la estabilidad física y la apariencia de esta bebida vegetal (Bernat et al. 2014).

Bernat et al. (2015) demostraron que la bebida a base de almendras fermentadas con bacterias potencialmente probióticas ejercen un efecto inmunomodulador en los macrófagos y no imparten efectos negativos en el metabolismo de las células epiteliales intestinales, especialmente cuando la bebida se fermento con bacterias para yogur.

El objetivo del presente trabajo fue la preparación de una bebida saludable a base de almendras que es apta para ser consumida por personas intolerantes a la lactosa, celíacas, embarazadas, con problemas de obesidad y veganas, por su elevado contenido en calcio, fósforo y potasio. Además se llevó a cabo el análisis de las propiedades fisicoquímicas y la determinación de la vida útil haciendo uso de la pasteurización y de diferentes condiciones de almacenamiento. Estos estudios son claves para el desarrollo de producto final que tiene como matriz a esta bebida de almendras y adicionada de bacterias lácticas probióticas y extracto concentrado de Topinambur *(Helianthus tuberosus)* rico en inulina y fructooligosacáridos (FOS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de la bebida vegetal se siguió la metodología de Dhakal et al. (2014) y se emplearon almendras enteras de una marca comercial, procedentes de Las Heras (Mendoza), que fueron dejadas en remojo en agua pura a 4ºC durante 12 h. La relación empleada de agua /almendras fue 3:1. Transcurrido el tiempo establecido, se drenó el agua de las semillas y se pelaron en forma manual y asépticamente. Empleando una relación de una parte en peso seco de almendras por nueve partes de agua potable, se adicionaron 9 partes de agua pura y procesaron a baja velocidad durante 3 min. La suspensión resultante se filtró a través de una bolsa filtrante de muselina, montada sobre un colador en un vaso de precipitados de 1000 ml.

La pasteurización se llevó a cabo según los requerimientos de pasteurización para leche (U.S. Grade A Pasteurized milk ordinance–1978 Recommendations of the USPHS/FDA) a 63ºC durante 30 min y posterior enfriamiento rápido a temperatura no superior a 4°C.
Algunos análisis se llevaron a cabo con la bebida cruda y pasteurizada para comparar resultados del efecto del tratamiento térmico. Todos los análisis se realizaron por triplicado.
A continuación se listan los materiales e instrumentos para llevar a cabo los análisis fisicoquímicos:
pH: se empleó peachímetro y temperatura de muestras a 25ºC.
Grados Brix: Se utilizó un refractómetro Abbé portátil.
Densidad: Se usó densímetro de vidrio adecuado para el líquido en estudio.
Viscosidad: se empleó un viscosímetro Brookfield LVT.
Acidez expresada como porcentaje de ácido láctico: Por titulación con NaOH 0,1 N.
Cenizas expresadas como porcentaje en peso (Método AOAC, 2000): En un crisol previamente pesado (W1), se pesó 10g (W2) de muestra y se llevó a una mufla a 550ºC. Se dejó enfriar en desecadora y se pesó (W3).

$$\%Cenizas= (W3-W1)*100 / (W2-W1) \quad (1)$$

Humedad como porcentaje (Método AOAC, 2000): En una cápsula limpia y seca en estufa hasta peso constante (Wo), fue pesada y se añadió 10g (W1) de muestra, se llevó a estufa a 105ºC durante 4hs. Posteriormente, se enfrió en desecadora hasta peso constante (W2)(g) y luego se calculó el porcentaje de humedad.

$$\%`Humedad = (W1-W2)*100 / (W1-Wo) \quad (2)$$

Proteínas como porcentaje (Método de Kjeldahl-Hach): Se basa en volumetría ácido-base con empleo de ebullición. La muestra se descompone en un medio caliente de ácido sulfúrico concentrado que efectúa la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco el amonio es retenido como bisulfato de amonio y puede ser determinado in situ o por destilación alcalina y titulación.
Materia grasa (Método Bligh y Dyer): Se prepara leche de almendras según se explicó al inicio de esta sección. Se homogeniza y se toman 16 ml con una pipeta y se añade a un vaso de precipitados de 20 ml. A la muestra se agrega 20 ml de cloroformo, luego 40 ml de etanol y finalmente 20 ml de cloroformo, agitando la muestra durante 30 min luego de cada agregado. Se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min y se extrae con jeringa la capa inferior tratando de no alterar la capa superior. Se homogeneiza y se toman 10 ml que se llevan a estufa a 60ºC en un Erlenmeyer previamente pesado, hasta peso constante. La diferencia es el peso de grasa Wf (g) de la muestra
Cálculos:

$$\%Grasa= (100*40*Wf) / (16*10) \quad (3)$$

Nitrógeno proteico como porcentaje: Se determina a partir del contenido de proteína de la muestra. El valor obtenido a partir del método de Kjeldahl se lo multiplica por un factor (6,25) que determina el porcentaje de proteína en la muestra.
Recuento promedio de hongos y levaduras: Se realizó en el laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Tecnológicas (INTI-San Luis), sobre muestras de bebida pasteurizada y sin pasteurizar. El recuento de hongos y levaduras se realizó de acuerdo al capítulo 18 Levaduras, mohos y micotoxinas del Manual Microbiologico de la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU.) Abril 2001.
Recuento promedio de bacterias lácticas: También fue analizado en los laboratorios de INTI y se realizó de acuerdo al capítulo 19, Compendiums of Methods For The Microbiological Examination Of Foods Fourth Edition American Public Association utilizando agar MRS.
Estudio de vida útil (Shelf-life): Se prepararon dos lotes de la bebida en estudio, un lote pasteurizado y otro no. Para la conservación de las muestras se usaron dos metodologías; una de ellas fue en estufa a 25ºC y la otra bajo refrigeración en heladera a 5ºC. Los lotes fueron fraccionados en recipientes estériles. Para su

evaluación, se extrajeron diariamente muestras de cada condición y se testeó contra una muestra fresca de bebida vegetal. Los análisis que se practicaron fueron control visual, aroma, color y pH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados en la bebida de almendras preparada por el método de elaboración descripto anteriormente.
Los resultados del análisis químico proximal son similares a los hallados por otros autores (Bernat N. 2014).
En los recuentos de hongos y levaduras no hubo reducción decimal entre las leches pasteurizadas de las no pasteurizadas, pero sí se observó un cambio de la flora presente; en las muestras pasteurizadas predominaron colonias cremosas rosas (levaduras) mientras que en las muestras sin tratar crecieron hongos filamentosos y solo algunas colonias rosas.
En los recuentos de bacterias, las muestras pasteurizadas mostraron la reducción decimal en un nivel con respecto a las no pasteurizadas, algo lógicamente esperado. Con respecto a la concentración de sólidos solubles (º Brix) no se observaron diferencias significativas del material tratado térmicamente y sin tratar.
En el análisis de vida útil (shelf-life) se observó que las muestras recién pasteurizadas (**Figura 1**) mostraban separación de fases, observándose una capa superior formada por un polvillo fino y movedizo, que también fueron observadas en las muestras crudas pero distribuidas en todo el volumen. El pH de las muestras fueron 6,45 y 6,4; respectivamente.

Tabla 1. Resumen de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos efectuados sobre la bebida a base de almendras.

% Agua absorbida (promedio) durante el remojo		18,34
pH (25ºC)	Bebida Sin Pasteurizar	6,44
	Bebida Pasteurizada	6,39
ºBrix	Bebida Sin Pasteurizar	5,6
	Bebida Pasteurizada	5,5
% Ácido Láctico		0,05
Cenizas		0,261
Humedad		92,71
% Proteínas		1,615
% Materia Grasa		4,98
% Nitrógeno Proteico		10,09
Densidad (25ºC)		1,00 g/cm^3
Recuento Promedio de Bacterias lácticas y levaduras	Bebida Sin Pasteurizar	2,25x10^{4}UFC/ml
	Bebida Pasteurizada	4,35x10^3 UFC/ml
Recuento Promedio de Hongos y levaduras	Bebida Sin Pasteurizar	5,35x10^{3}UFC/ml
	Bebida Pasteurizada	7,85x10^3 UFC/ml

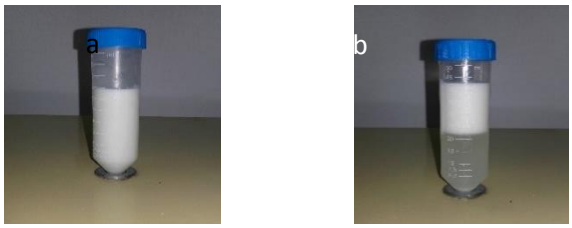


Figura 1. Bebida a base de almendras recién elaborada – Día 1: a) sin pasteurizar; b) pasteurizada

Al segundo día (**Figura 2**) Las muestras refrigeradas mantenían el pH sin variaciones, al igual que el aroma se notó muy similar a la muestra fresca. La muestra tratada térmicamente mostraba un sobrenadante cuyo espesor fue menor que la observada en el día 1.

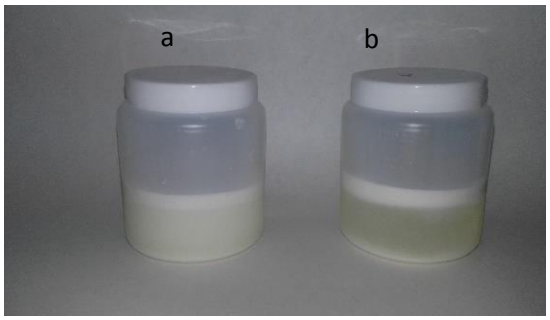


Figura 2. Día 2: Muestras refrigeradas: a) No Pasteurizada; b) Pasteurizada

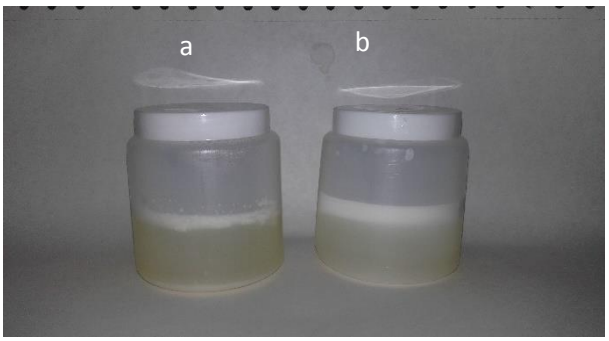


Figura 3. Día 2: Muestras de estufa: a) No Pasteurizada; b) Pasteurizada

Las muestras almacenadas a 25ºC en estufa se vieron muy afectadas por la condición de almacenamiento. El aroma de ambas muestras no era desagradable, pero no poseían el aroma de la bebida recién elaborada, se notó una leve pérdida de frescura y el olor sui generis de la bebida de almendras. El pH se vio poco afectado por la temperatura de conservación y se observó una disminución a 6,33 y 6,29 para muestras tratadas y cruda (**Figura 3**).

Al tercer día, se observó una disminución más pronunciada de pH, en las muestras de estufa y su olor estaba alterado. Se pudo diferenciar el aspecto del sobrenadante entre ambas muestras. En la **Figura 4** se puede ver que la muestra sin tratamiento térmico presentan grumos y un pH 6,23, mientras que la muestra pasteurizada con pH 6,25, un aspecto cremoso, sin grumos. Ambas muestras estuvieron a la misma temperatura de 25ºC.

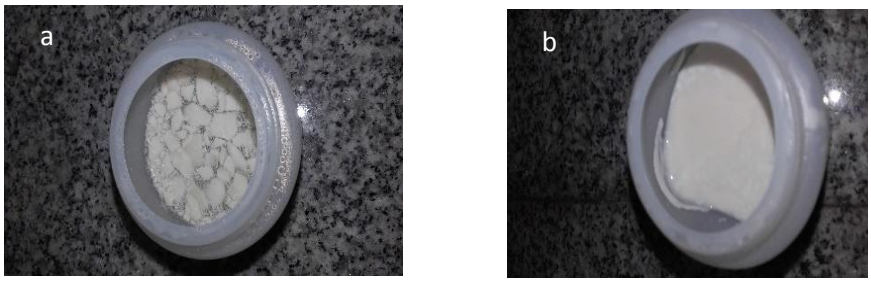


Figura 4. Forma de sobrenadante de muestras de estufa Día 3: a) No Pasteurizada; b) Pasteurizada

En la **Figura 5**, se puede observar la cantidad de sobrenadante al cuarto día de control de las muestras en estufa. En la muestra b) la capa superior siempre fue mayor con respecto a la muestra a) y el color de la fase acuosa (inferior) más blanquecina en a) que b). El pH encontrado fue de 6,74 y 6,64 para las muestras a) y b) respectivamente.
Las dos muestras poseían aromas diferentes, ninguna de ellas desagradable, pero la muestra con el tratamiento térmico se sintió más "fresca" que la muestra sin pasteurizar.
Observaciones microestructurales revelan que las proteínas de las almendras no contribuyen a la estabilidad de las emulsiones, como si lo hacen las de leche, debido a su carácter hidrofóbico en comparación al carácter altamente hidrofílico de las caseínas en las leches.

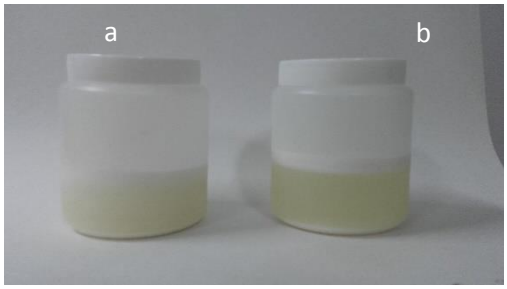


Figura 5. Forma de sobrenadante de muestras de estufa Día 4: a) No Pasteurizada; b) Pasteurizada

Por este motivo, se producen la floculación de las micelas proteína-grasa, al no existir el efecto de repulsión electrostática y a la vez estabilizador de las micelas, dando lugar a clusters de proteína-grasa. Estos clusters crecen progresivamente dando lugar a la separación de fases. Los tratamientos térmicos provocan la desnaturalización de las proteínas que aumentan el proceso de agregación (Walstra 2003). Sin embargo, cuando las muestras son previamente homogeneizadas por altas presiones, la desnaturalización y la agregación de las proteínas séricas parecen contribuir a la formación de una red tridimensional que ejerce un efecto estabilizador que inhibe en menor medida la separación de fases durante el almacenamiento. Por eso, la combinación de tratamientos térmicos suaves como la pasteurización y altas presiones de homogeneización mejoraría la estabilidad física, y se evitaría tener que recurrir al uso de aditivos alimentarios, obteniendo de esta forma productos más naturales de alto valor añadido.
Estudios posteriores serán llevados a cabo, añadiendo a la bebida vegetal de almendras un extracto rico en inulina y fructooligosacáridos (FOS) para mejorar en el tiempo la estabilidad de esta emulsión.

CONCLUSIONES

Los resultados de las determinaciones fisicoquímicas y análisis microbiológicos permitieron caracterizar una bebida elaborada a base de almendras. Los estudios de vida útil bajo dos condiciones de almacenamiento permitieron concluir que las muestras recién pasteurizadas presentan separación de fases. La temperatura de almacenamiento no afectó significativamente la estabilidad de las emulsiones. En las muestras conservadas

en estufa (25°C) se observó un cambio en sus propiedades organolépticas luego de las 24 hs, mientras que las muestras almacenadas a baja temperatura se conservaron hasta 72 hs en perfectas condiciones, observándose pasado ese tiempo una leve pérdida de aroma y sabor, especialmente en la muestra cruda.

BIBLIOGRAFÍA

Bernat N, Cháfer M, Chiralta A, Laparra JM, González-Martínez C. 2015. Almond milk fermented with differente potentially probiotic bacteria improves iron uptake by intestinal epithelial cells. International Journal of foods studies, 4:49-60.

Bhaskaran, S, Hardley, F (2002). Buyer's beliefs, attitudes and behavior: Foods with therapeutic claims. Journal of Consumer Marketing, 19: 591–606.

Dhakal S, Changqi L, Zhangc Y, Roux K, Sathe S. 2014. Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk. Food Research International, 62:215–222.

Fatemeh A, Ahmad Salihin B, Misni M (2014). Replacement of bovine milk with vegetable milk: Effects on the survival of probiotics and rheological and physicochemical properties of frozen fermented dessert. International Journal of Diary Technology, 69:71-80.

Fraser, GE, Bennett, HW, Jaceldo, KB, Sabaté J (2002). Effect on body weight of a free 76 kilojoules daily supplement of almonds for six months. Journal American Collection Nutrition, 21: 275-283.

Kris-Etherton, PM, Hu, FB, Rose, E, Sabaté, J (2008). The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. Journal of Nutrition, 138: 1746S-1751S.

Osborn, HT, Shewfelt, RL, and Akoh, CC (2003). Sensory evaluation of a nutritional beverage containing canola oil/caprylic acid structural lipid. Journal of the American Oil Chemists Society, 80:357-360.

Pinto SS, Fritzen-Freire CB, Munoz IB, Prudencio ES and Amboni RD (2012). Effects of the addition of microencapsulated Bifidobacterium BB-12 on the properties of frozen yogurt. Journal of Food Engineering, 111: 563-569.

Rojas P, Pallarés M. 2012. Desarrollo y Caracterización de una nueva bebida de avena. Tesis de Máster de Calidad, Desarrollo e Innovación de alimentos.

Madrigal, L, Sangronis, E (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición-Órgano oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. 57 Nº 4:387:396.

Tey, SL, Brown, RC, Chislholm, AW, Delahunty, CM, Gray, AR, Williams, SM (2011). Hazelnuts on blood lipids and alpha-tocopherol concentrations in midly hypercholesterolemic individuals. European Journal of Clinical Nutrition, 65:117-124.

Efecto del método de secado del mucílago de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre sus propiedades fisicoquímicas y funcionales

Orifici S.C.[1], Capitani M.I.[1,2], Tomás M.C.[2], Nolasco S.M.[1]

(1) TECSE, Dto. Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería - UNCPBA, Olavarría, Bueno Aires, Argentina.
(2) CIDCA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas - UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
marianelacapitani411@hotmail.com

RESUMEN

Se analizó comparativamente el efecto del método de secado del mucílago de chía sobre sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. El mucílago se extrajo mediante exudación con agitación mecánica, secado mediante liofilización (MI) y estufa por circulación de aire caliente (MII) y separación por tamizado. El MI permitió obtener un mayor rendimiento de extracción que el MII (12,4 y 3,4% base seca b.s.-, respectivamente), alcanzando en una segunda etapa de extracción un 6,8 (MI) y un 3,5 (MII) % (b.s.). El mucílago obtenido según MI presentó una textura más suave, esponjosa y liviana y un color beige más claro y opaco que el obtenido por el MII. Los diferentes métodos de secado no afectaron significativamente la humedad de los mucílagos ($p>0,05$). Ambos mucílagos evidenciaron altos porcentajes de proteínas (16,4 y 14,7% b.s.) y bajos en fibra cruda (7,9 y 9,3% b.s., para MI y MII, respectivamente). El MI permitió generar un mucílago con mejores propiedades relacionadas con componentes lipídicos, mientras que el MII un mucílago con mejor capacidad de retención de agua. En general, el método de secado empleado afectó las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los mucílagos, observándose algunas características particulares que los diferenciaron entre sí.

Palabras Clave: *Salvia hispanica* L., mucílago de chía, secado, propiedades fisicoquímicas y funcionales

ABSTRACT

The effect of drying method on the physicochemical and functional properties of chia mucilage were comparatively analyzed. The mucilage was obtained by exudation with mechanical agitation, drying through freeze drying (MI) and oven by hot air circulation (MII) and separation by sieving. The MI yielded a higher extraction yield than MII (12.4 and 3.4% dry basis - b.s.-, respectively), reaching in a second extraction step 6.8 (MI) and 3.5 (MII) % (bs) of mucilage, respectively. The mucilage obtained according MI presented a softer, fluffy, light texture and lighter and opaque than the obtained by the MII beige color. The different drying methods did not affect significantly ($p>0.05$) mucilage moisture. Both mucilages showed high percentages of protein (16.4 and 14.7% d.b.) and low crude fiber (7.9 and 9.3% d.b., for MI and MII, respectively). The MI generated mucilage with better properties related to lipid components, while MII showed better water retention capacity. In general, the drying method employed affected the physicochemical and functional properties of mucilage, with some characteristics differing from one another.

Keywords: *Salvia hispanica* L., chia mucilage, drying, physicochemical and functional properties

INTRODUCCIÓN

El mucílago extraído de las semillas de chía, es un heteropolisacárido aniónico cuyos azucares predominantes son xilosa y glucosa en una relación aproximadamente 2:1, además de presentar una cantidad significativa de ácidos úronicos (galacturónico y glucurónico) y azúcares neutros, como arabinosa y galactosa. Cabe considerar, que la estructura molecular así como la composición química y las propiedades funcionales son factores que importan a la hora de decidir la idoneidad de un polisacárido para su aplicación

en la industria alimentaria y/ó farmacéutica (Timilsena et al., 2016). El mucílago de chía se encuentra dentro de las células epidérmicas de la testa (cubierta externa) de la semilla madura y cuando ésta se pone en contacto con agua se rompe la primera capa de células, permitiendo la salida de las fibras de mucílago que luego rodearán la semilla. Cuando el mucílago está hidratado por completo, forma una cápsula transparente que rodea la semilla, adhiriéndose a ella con gran tenacidad (Muñoz et al., 2012a, Capitani et al., 2013). Se han desarrollado diversos métodos para su extracción que contemplan diferentes pretratamientos de las semillas, técnicas de agitación, relación semilla:agua, tiempos y temperaturas de remojado (Muñoz et al., 2012a, Coorey et al., 2014, Segura-Campos et al., 2014, Capitani et al., 2015). En todos los métodos se aplica, en primera instancia, la exudación del mucílago en medio acuoso. Cabe destacar que las condiciones operativas de extracción tienen efectos significativos no sólo sobre el rendimiento, sino también sobre la pureza y la viscosidad relativa de los polisacáridos crudos (Wu et al., 2007). La información existente en cuanto a las propiedades funcionales del mucílago de chía indica que se trata de un polímero con acción espesante con una elevada viscosidad en agua y posibles efectos metabólicos benéficos (Lin et al., 1994, Marin Flores et al., 2008). Capitani et al., (2015) estudiaron la viscosidad de dispersiones acuosas con la incorporación de este polisacárido, indicando que la misma aumenta al incrementar la concentración del mismo de 0,25 a 1,00% (p/v). Por otra parte, se ha demostrado que la inclusión de mucílago de chía en reemplazo de huevo y aceite, en la elaboración de tortas, mantiene las propiedades funcionales y sensoriales debido a su acción espesante (Borneo et al., 2010). Recientemente, se ha indicado que dicho mucílago puede ser empleado para su inclusión en la elaboración de películas funcionales biodegradables (Muñoz et al., 2012b, Capitani et al., 2016). La ingesta de mucílago de chía sólo o en combinación con la semilla, tiene influencia sobre el metabolismo de lípidos mediante la disminución de la absorción intestinal de ácidos grasos, colesterol y el arrastre de sales biliares, aumentando la pérdida de colesterol a través de las heces, además de inhibir la síntesis endógena de colesterol y la desaceleración de la digestión y la absorción de nutrientes (Hentry et al., 1990). Así, el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del mucílago de chía, resulta de alta consideración para conocer su aplicabilidad industrial en el desarrollo de diferentes formulaciones alimentarias. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar comparativamente el efecto del método de secado del mucílago de chía sobre sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Los ensayos experimentales, se realizaron empleando semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) provistas por la empresa DUSEN SRL., Argentina.

Obtención del mucílago de chía

Método I (MI)

El mucílago se obtuvo siguiendo la técnica descripta por Capitani et al. (2013) con algunas modificaciones. Semillas de chía enteras se remojaron en agua (1:31 p/v), con agitación mecánica durante 2 h y a 85ºC. Esta mezcla se distribuyó en bandejas de plástico (capa de 1 cm de espesor) las cuales se cubrieron con papel aluminio, se congelaron a -20ºC durante 96 h y se liofilizaron (-50ºC, 26 Pa, 120 h) (Liofilizador Boyikang Laboratory Instruments IncFD-1A-50, China). Por último, el mucílago seco se separó de las semillas mediante un proceso de tamizado (malla Nº 20 ASTM, 840 m), en tres periodos de 15 min cada uno.

Método II (MII)

El mucílago se obtuvo según la metodología previamente descripta por Muñoz et al. (2012a). Así, las semillas enteras de chía se remojaron en agua (1:40 p/v) con agitación mecánica a 80ºC durante 2 h. Esta mezcla se distribuyó en bandejas de vidrio y se eliminó el agua mediante secado en estufa por circulación de aire caliente a 50ºC, durante 18 h. Por último, el mucílago seco se separó de las semillas mediante un proceso de tamizado (malla Nº 35 ASTM, 500 µm), en tres períodos de 15 min cada uno.

Los dos tipos de mucílago se guardaron en frascos de plástico cerrados herméticamente y se almacenaron en desecador para protegerlos de la humedad.

Determinación del mucílago residual

Las semillas obtenidas después de la primera extracción con cada una de las metodologías, se sometieron a una segunda extracción bajo las mismas condiciones operativas. Asimismo, a las semillas procesadas según el Método II se las sometió a una segunda extracción bajo las condiciones del Método I.

Caracterización de los mucílagos

Propiedades fisicoquímicas

Se realizó la caracterizaron proximal determinando el contenido de humedad (AOCS Ba 2ª-38, 1998), cenizas (Método Oficial AOCS Ba 5ª-49, 1998), aceite (IUPAC 1.122, 1992), proteínas (AOAC, 1990) y fibra cruda (AOCS Ba 6-84, 1998). El contenido de extractos libres de nitrógeno, se calculó por diferencia restando a 100 las cenizas, aceite, proteínas y fibra cruda.

Propiedades funcionales

Se determinaron las siguientes propiedades funcionales: capacidad de retención de agua (CRA), capacidad de retención de aceite (CRAc.), actividad y estabilidad emulsificante (Chau et al., 1997), capacidad de absorción de agua (CAb) (AACC 88-04, 1984), capacidad de adsorción de agua (CAd) (Chen et al., 1984) y capacidad de absorción de moléculas orgánicas (CAMO) (Zambrano et al., 2001).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA seguido por el test de Tukey ($p<0,05$), usando el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1** puede observarse el aspecto visual de los mucílagos obtenidos por cada metodología. El secado por liofilización (Método I), permitió obtener un mucílago con una textura más suave, esponjosa, liviana y de un color beige más claro, pero opaco, que el mucílago obtenido por secado en estufa por circulación de aire caliente (Método II). Las diferencias observadas en cada uno de los mucílagos obtenidos pueden atribuirse a las condiciones operativas aplicadas en cada Método. Las altas temperaturas empleadas durante la exudación (80 - 85°C) afectó el color del mucílago, produciendo un leve pardeamiento. A su vez, en el Método II, el secado en estufa con circulación de aire caliente (50°C, 18 h) también puede haber afectado el aspecto final del mismo.

El Método I logró alcanzar un rendimiento de extracción de mucílago de chía de 12,4±0,65% b.s., siendo dicho valor superior al obtenido mediante el Método II (3,4±0,14% b.s.) y a los informados por Reynoso-Cortés (2002) (1,3% b.s.), Muñoz et al. (2012a) (7% b.s.) y Capitani et al. (2015) (4% b.s.), mientras que resultó cercano al reportado por Marín Flores et al. (2008) (15% b.s.). En tanto, el rendimiento de extracción alcanzado por el Método II fue aproximadamente la mitad que el obtenido por Muñoz et al. (2012a) en mucílago de chía extraídos de semillas de origen chileno y aplicando la misma metodología de extracción (7% b.s.).

Figura 1. Mucílago obtenido mediante el Método I (izquierda) y mediante el Método II (derecha).

Mucílago residual

Las semillas previamente tratadas por el Método I, y sometidas a una segunda extracción por la misma metodología, presentaron un contenido de mucílago residual de 6,8±0,42% b.s. Esto puede relacionarse con estudios previos realizados por Capitani et al. (2013) sobre la caracterización microestructural de semillas de chía con previa extracción de mucílago (aplicando secado por liofilización), quienes observaron que la superficie de dichas semillas presenta pequeñas células del mesocarpio espaciadas, las cuales quedarían expuestas a liberar sustancias mucilaginosas durante un segundo proceso de extracción. Por otra parte, las semillas previamente tratadas por el Método II y aplicando una segunda extracción por la misma metodología, exhibieron un rendimiento significativamente inferior ($p<0,05$) de mucílago residual (3,3±0,23% b.s.). Sin embargo, someter a estas semillas a una segunda extracción con las condiciones del Método I originó un 8,7±0,47% de mucílago residual. Esto afirma la mayor efectividad del Método I (secado por liofilización) para la extracción del mucílago de chía. Cabe destacar, que dicho rendimiento fue significativamente mayor ($p<0,05$) al alcanzado por Bertolli (2015) (7,3±0,17% b.s. de mucílago residual) quien aplicó una segunda extracción por el Método I (secado por liofilización), pero bajo condiciones operativas diferentes (1:20 -p/v-, 1 h, a temperatura ambiente y con agitación mecánica).

Composición proximal

En la **Tabla 1** se presenta la composición proximal de los mucílagos obtenidos por el Método I y Método II respectivamente. Puede observarse, que el contenido de humedad de ambos mucílagos no se diferenció significativamente ($p>0,05$), a pesar de utilizar diferentes métodos de secado. Los dos mucílagos presentaron altos porcentajes de proteínas, pero bajos de fibra cruda. Si bien no se detectaron diferencias significativas entre ambos mucílagos en lo que al contenido de fibra cruda respecta, el porcentaje proteico fue significativamente superior ($p<0,05$) en el mucílago obtenido por el Método I. Asimismo, el contenido de cenizas fue significativamente mayor ($p<0,05$) en el mucílago obtenido por secado por liofilización, siendo dicho valor similar al informado por Capitani et al. (2015) para mucílago de chía obtenido bajo la misma metodología pero con distintas condiciones operativas (relación semilla:agua 1:10 –p/v-, 4 h y exudación a temperatura ambiente) y aplicando el mismo método de secado (liofilización). Por otra parte, el contenido de lípidos residuales de los mucílagos estuvo comprendido entre 9 y 11,5% b.s. sin diferenciarse significativamente entre sí ($p>0,05$).

Tabla 1. Composición proximal del mucílago de chía

Componente	Contenido (%, b.s.)	
	Mucílago Método I	Mucílago Método II
Humedad	7,93 ± 0,4 [a]	7,70 ± 0,3 [a]
Proteínas	16,40 ± 0,01 [b]	14,66 ± 0,21 [a]
Cenizas	10,31 ± 0,12 [b]	9,12 ± 0,01 [a]
Lípidos residuales	9,05 ± 0,74 [a]	11,46 ± 0,29 [a]
Fibra Cruda	7,92 ± 0,51 [a]	9,29 ± 0,02 [a]
ELN*	56,33 ± 1,14 [a]	55,49 ± 0,05 [a]

ELN: extracto libre de nitrógeno; *Calculado por diferencia.
Valores seguidos por letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

Cabe destacar que el contenido proteico presente en un polisacárido, puede estar asociado a la presencia natural de proteínas estructurales y enzimas, como así también a una posible contaminación del mismo con parte de la semilla. Así, un bajo porcentaje de proteínas está relacionado con la pureza del mucílago, a menos que éstas se encuentren asociadas al mismo (Karazhiyan et al., 2011). Timilsena et al. (2015) extrajeron y purificaron mucílago de chía, el cual presentó un 93,8% de hidratos de carbono, un 2,3% de proteínas y un

0,6% de aceite (todos expresados en base seca), quienes sugieren la posible existencia de uniones covalentes entre proteínas y lípidos con el polisacárido.

Propiedades funcionales

En la **Figura 1** se presentan las propiedades funcionales del mucílago de chía obtenido con cada metodología. Puede observarse que, la capacidad de retención de agua fue significativamente superior ($p<0,05$) en el mucílago que fue secado por circulación de aire caliente (Método II), mientras que la capacidad de absorción de agua fue significativamente mayor ($p<0,05$) en el mucílago secado por liofilización (Método I), no observándose diferencias significativas para la capacidad de adsorción de agua ($p>0,05$). La capacidad de retención de agua puede relacionarse con el contenido de fibra cruda (principalmente compuestos celulósicos, **Tabla 1**), presentes en una muestra, dado que la fibra dietética insoluble se caracteriza por retener más agua en su estructura que la fibra dietética soluble (Capitani et al., 2012). Si bien, no se observaron diferencias significativas en el contenido de fibra cruda entre los mucílagos estudiados ($p=0,06$), se detecta una tendencia a mayor contenido de la misma en el mucílago que fue secado por circulación de aire caliente, lo que podría influir en una mayor CRA en este mucílago respecto al mucílago secado por liofilización. Cabe destacar que la capacidad de retención de agua es importante en relación a la formulación y el procesamiento de alimentos con alto contenido de fibra, mientras que la capacidad de absorción de agua resulta de interés en procesos, tales como la extrusión, donde la materia prima será humectada antes o durante el mismo (Zambrano et al., 2001). Por otra parte, las propiedades relacionadas con la afinidad a distintos componentes lipídicos (CRa y CAMO) fueron significativamente mayor ($p<0,05$) en el mucílago secado por liofilización, esto puede relacionarse con el menor contenido de lípidos residuales de este mucílago respecto al mucílago que fue secado por circulación de aire caliente (**Tabla 1**).

Con respecto a las propiedades emulsificantes, si bien no se presentaron diferencias significativas en la actividad emulsificante, dicha propiedad arrojó un mayor valor en el mucílago obtenido mediante el Método I con respecto al generado por el Método II. Sin embargo, la estabilidad emulsificante fue signicativamente mayor ($p<0,05$) en el mucílago proveniente de un secado por liofilización con respecto al mucílago secado por circulación de aire caliente (**Figura 2**). Estos resultaron indicarían una mejor calidad del mucílago secado por liofilización para ser aplicado en la formulación de emulsiones alimentarias.

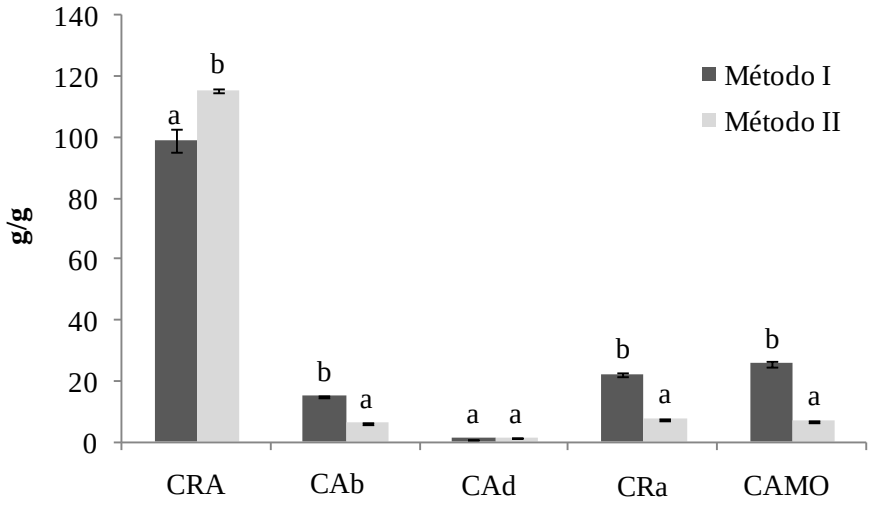


Figura 1. Propiedades funcionales del mucílago de chía (*Salvia hispanica* L.)

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$). CRA: Capacidad de retención de agua; CAb: Capacidad de absorción de agua; CAd: Capacidad de adsorción de agua; CRa: Capacidad de retención de aceite; CAMO: Capacidad de absorción de moléculas orgánicas.

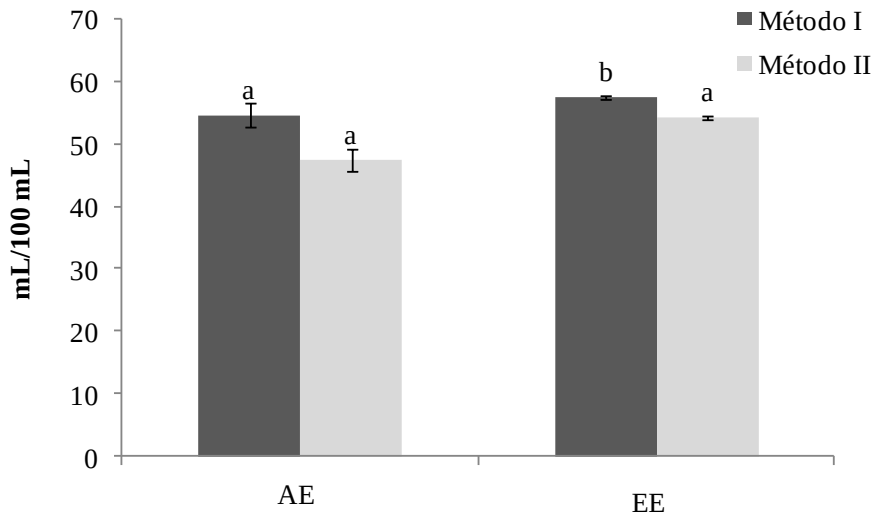


Figura 2. Propiedades emulsificantes del mucílago de chía (*Salvia hispanica* L.)
Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05). AE: Actividad emulsificante; EE: Estabilidad emulsificante.

CONCLUSIONES

El Método I (secado por liofilización) permitió obtener un rendimiento de extracción de mucílago significativamente superior (p<0,05) al logrado aplicando el Método II (secado por circulación de aire caliente). Asimismo, se determinó que ambos métodos aplicados en una sola etapa no extraen el mucílago en forma exhaustiva, quedando mucílago residual. La aplicación de una segunda etapa de extracción con el Método I resultó más efectiva que con el Método II. Los mucílagos obtenidos por los dos métodos presentaron algunas características particulares que los diferencian. En lo que respecta al aspecto, se diferenciaron en cuanto al color y la textura. El mucílago secado por liofilización presentó un contenido de proteínas significativamente mayor que el mucílago secado por circulación de aire caliente. El Método II permitió obtener un mucílago con una mayor capacidad de retención de agua que el Método I, lo que puede relacionarse con su mayor contenido en fibra cruda. Por el contrario, el Método I generó un mucílago cuyas principales propiedades se relacionaron con los componentes lipídicos (capacidad de retención de aceite y de absorción de moléculas orgánicas), consistente con el menor contenido lipídico de este mucílago. Las propiedades emulsificantes indicarían una mejor calidad del mucílago secado por liofilización para ser aplicado a la formulación de emulsiones alimentarias. Según los resultados obtenidos, la elección del Método de secado (liofilización o circulación de aire caliente) estaría condicionada en función de las aplicaciones finales del mucílago. Sin embargo, el mayor rendimiento alcanzado mediante el secado por liofilización vuelve a este método como el más indicado para su extracción.

BIBLIOGRAFÍA

AACC. 1984. Official Methods of Analysis, 12th ed. St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists.
AOAC. 1990. Official methods of analysis, 15th ed. AOAC International, Gaithersburg, USA, 1067 p.
AOCS. 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign, USA.
Bertolli MP, Capitani MI, Tomás MC, Nolasco SM. 2015. Efecto del proceso de extracción del mucilago de chía sobre las características fisicoquímicas y funcionales del aceite y de la harina. Proceeding World

Congress on Oils & Fats and 31st ISF Lectureship Series y XVI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Rosario, Argentina, p. 30.
Borneo R, Aguirre A, Leon AE. 2010. Chia (*Salvia hispanica* L) gel can be used as egg or oil replacer in cake formulations. Journal of the American Dietetic Association, 110: 946-949.
Capitani MI, Matus-Basto A, Ruiz-Ruiz JC, Santiago-García JL, Betancur-Ancona DA, Nolasco SM, Tomás MC, Segura-Campos MR. 2016. Characterization of biodegradable films based on *Salvia hispanica* L. protein and mucilage. Food and Bioprocess Technology, 9(8): 1276-1286.
Capitani MC, Corzo-Rios LJ, Chel-Guerrero LA, Betancur-Ancona DA, Nolasco SM, Tomás MC. 2015. Rheological properties of aqueous dispersions of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage. Journal of Food Engineering, 149: 70-77.
Capitani MI, Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC. 2013. Microestructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 93(15): 3856-3862.
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.
Chau C, Cheung K, Wong Y. 1997. Functional properties of protein concentrate from three Chinese indigenous legume seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2500-2503.
Chen J, Piva M, Labuza TP. 1984. Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. Journal of Food Science, 49: 59-63.
Coorey R, Tjoe A, Jayasena V. 2014. Gelling properties of chia seed and flour. Journal of Food Science, 79(5): 859-866.
Hentry HS, Mittleman M, McCrohan PR. 1990. Introducción de la chía y la goma de tragacanto en los Estados Unidos. En: Janick J, Simon JE, editores. Avances en Cosechas Nuevas. Prensa de la Madera, Pórtland, O. pag 252-256.
Infostat Group, Infostat version 2004. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina 2004.
IUPAC. 1992. Standard Methods for the Analysis of oils, Fats and Derivates, 7th ed. Eds. Paquot C, Hautffenne A. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford, UK.
Karazhiyan H, Razavi SMA, Phillips GO. 2011. Extraction optimization of a hydrocolloid extracted from cress seed (Lepidium sativum) using response surface methodology. Food Hydrocolloids, 25: 915-920.
Lin KY, Daniel JR. 1994. Structure of chía seed polysaccharide exudate. Department of Foods and Nutrition, 23: 13-18.
Marin Flores FF, Acevedo MJ, Tamez RM, Nevero MJ, Garay AL. 2008. WO/2008/0044908 Method for obtaining mucilage from *Salvia hispanica* L. Word Internacional Property Organization.
Muñoz LA, Cobos A, Diaz O, Aguilera JM. 2012a. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. Journal of Food Engineering, 108: 216-224.
Muñoz LA, Aguilera JM, Rodriguez-Turienzo L, Cobos A, Diaz O. 2012b. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. Journal of Food Engineering, 111: 511-518.
Reynoso-Cortés LB. 2002. Extracción, separación y caracterización reológica del mucílago de la semilla de chía (*Salvia spp.*). Tesis Licenciatura en Ingeniería en alimentos. Universidad Simón Bolivar. México D.F.
Segura-Campos MR, Acosta-Chi Z, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero LA, Betancur-Ancona, DA. 2014. Whole and crushed nutlets of chia (*Salvia hispanica*) from Mexico as a source of functional gums. Food Science and Technology, 34(4): 701-709.
Timilsena YP, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B. 2015. Rheological and microstructural properties if the chia seed polysaccharide. International Journal of Biological Macromolecules, 81: 991-999.
Timilsena YP, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B. 2016. Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. Carbohydrate Polymers, 136: 128-136.

Wu Y, Cui SW, Tang J, Gu X. 2007. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. Analytical, Nutritional and Clinical Methods, 105: 1599-1605.
Zambrano ML, Meléndez R, Gallardo Y. 2001. Propiedades funcionales y metodología para su evaluación en fibra dietética. En: Lajolo MF, Saura-Calixto F, Witting E, Wenzel E, editores. Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Brasil: Varela, pag 195-209.

AGRADECIMIENTOS
Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET y a la Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires y Universidad Nacional de La Plata.

Actividad antioxidante de mieles argentinas de la provincia de Buenos Aires y la región Andino Patagónica

Patrignani M [(1)], Lupano CE[(1)]

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT La Plata CONICET, CIC, 47 y 116, La Plata, Bs.As., Argentina. mariela_patrignani@hotmail.com

RESUMEN

La composición de la miel depende del origen floral de las mismas, que a su vez está definido por la región geográfica de la cual procede. Sería entonces posible discriminar las mieles según su contenido de antioxidantes. Esto permitiría ofertar al mercado de productos con características distintivas de mayor cotización para su venta. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad antioxidante de mieles de 3 regiones fitogográficas de Buenos Aires (Oriental, Talar y Paranaense) y de mieles obtenidas en la región Andino-Patagónica. El contenido de compuestos fenólicos se determinó por la técnica de Folin, mientras que el contenido de antioxidantes se cuantificó mediante distintos ensayos: FRAP, ABTS y DPPH. Los resultados indicaron que en general el mayor contenido de antioxidantes lo presentaban las mieles de la región Andino Patagónica. El contenido de compuestos fenólicos se puedo relacionar con la actividad antioxidante encontrada a partir de los ensayos de FRAP y DPPH, pero no con el ensayo de ABTS. El análisis discriminante lineal indicó que las mieles de la región Andino Patagónica y la región de Buenos Aires Oriental se diferencian por su capacidad antioxidante, lo que permitiría aumentar el valor del mercado de estos productos.

Palabras clave: Antioxidantes, Mieles, Región Andino Patagónica, Provincia de Buenos Aires

ABSTRACT

Honey composition is strongly associated to its botanical origin which is closely related to the geographical area of production. Honey antioxidant content could be used to classify honey according to its geographical origin. Honey samples from 4 different regions of Argentina were collected: 3 from Buenos Aires (Oriental, Talar and Paranaense) and one from Patagonia Andina. The antioxidant capacity was determined by different assays (DPPH, ABTS and FRAP), the total phenolic content (TPC) was also evaluated. Honeys from Patagonia Andina showed a slightly higher antioxidant capacity when compared to samples from different regions. Moreover, the antioxidant capacity determined by DPPH and FRAP showed a good correlation with the TPC. Lineal discriminant analysis showed that honeys from Buenos Aires Oriental and Patagonia Andina regions could be correctly classified by their antioxidant activity and TPC.

Keywords: Antioxidants, Honey, Patagonia Andina, Buenos Aires province

INTRODUCCIÓN

El código Alimentario Argentino en su capítulo X define la miel como “el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas”. Argentina es un importante productor a nivel mundial, y es el segundo país exportador después de China. Sin embargo, casi la totalidad de la producción Argentina de miel se basa en la venta de esta como un commodity (producto a granel indiferenciado). Sin embargo, la tipificación de la miel de acuerdo a la región donde fue producida podría contribuir a abrir la producción a nuevos mercados en donde el producto se cotice mejor por su diferenciación. Actualmente productos con estas características son

altamente cotizados, y podrían significar un incremento de un 15 a un 30% en la cotización de venta de las mieles (Plan estratégico apícola 2016).
La Argentina está dividida en regiones fitogeográficas con características particulares, estudios previos han demostrado que las mieles de estas regiones podrían diferenciarse por su origen geográfico mejor que por su origen floral (Patrignani et al. 2016). Para poder lograr esta diferenciación es indispensable establecer los parámetros botánicos, fisicoquímicos y/o organolépticos indicadores de su origen.
La composición de la miel es compleja: el principal componente de la miel son los azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa, y otros azúcares superiores) (80%), mientras que el contenido de agua ronda el 17%, (Baldi 2010). Entre los componentes minoritarios se encuentran los minerales (0,17%), compuestos nitrogenados (0,04%), y en menor medida ácidos libres, lactonas, etc (Baldi 2010). Además, la miel contiene gran variedad de compuestos fenólicos. Los cuales poseen un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilo en su estructura (da silva et al. 2016). El interés particular en los compuestos fenólicos es su acción como antioxidantes, ya que captan radicales libres inhibiendo la peroxidación lipídica (da silva et al. 2016). Además su presencia se ha relacionado con propiedades benéficas para la salud como propiedades anticancerígenas, anti-inflamatorias, antiaterogénicas, antitrombóticas en incluso la modulación de la respuesta inmune (Estevinho et al. 2008). Estos efectos han dado un nuevo impulso al consumo de miel como endulzante natural, ya que existe una creciente demanda por productos sanos y beneficiosos para la salud (Patrignani et al. 2016).
Considerando todo esto, el presente trabajo tiene como objetivo contribuir a la búsqueda de marcadores que permitan la regionalización de las mieles argentinas a partir de su la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales (CFT). En el presente trabajo se analizaron mieles de distintas regiones de la provincia de Buenos Aires (en donde se centraliza más de la mitad de la producción) y de mieles obtenidas en la región Andino-Patagónica (una región productora en pleno desarrollo).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las mieles analizadas fueron recolectadas directamente de productores. De la provincia de Buenos Aires, se analizaron mieles de tres de sus siete regiones fitogeográficas: región Paranaense (6 muestras), Provincia del Espinal distrito del Talar (6 muestras) y de la provincia Pampeana, distrito oriental (6 muestras). Se analizaron además 6 muestras de productores de la región Andina Patagónica Argentina ubicada al sur de la de nuestro país (**Figura 1**). Si bien esta región ha aumentado su nivel de producción, el contenido de antioxidantes de estás mieles no ha sido evaluado aún.

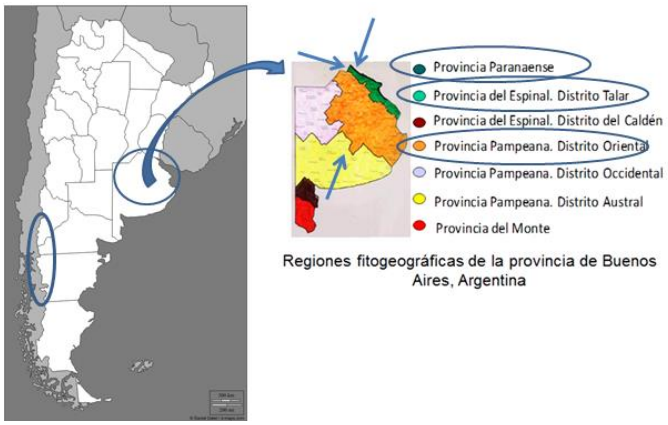


Figura 1. Regiones de recolección de mieles.

Preparación de las muestras

Para la determinación de la capacidad antioxidante, se pesaron 10,000 g de miel, se disolvieron con agua

destilada y se llevó a un volumen final de 25 ml en matraz aforado.

Contenido de fenoles totales (CFT)

El método de Folin-Ciocalteau fue utilizado para determinar el contenido de fenoles en las muestras de miel. Se agregó agua destilada (2300 µl) y 50 µl del reactivo de Folin a 50 µl de la muestra de miel preparada como se describió previamente. Se mezcló por agitación y 2 min después se agregaron 100 µl de Na_2CO_3 20% en NaOH 0,1 M. La mezcla se dejó reposar durante una hora en oscuridad. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro Hitachi U-1900, Tokio, Japón. Paralelamente se realizó una curva patrón con ácido gálico (250 µg/ml) y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/Kg de miel (Escuredo et al. 2013). Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Ensayo de DPPH

Se evaluó la capacidad de captación de radicales por medio del ensayo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) descripto por Brand-Williams et al. (1995). Se colocaron 0,025 ml de la muestra y 1,475 ml de una solución de DPPH recién preparada. Los resultados se expresaron como µg Trolox/mg de miel. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada muestra.

Ensayo de FRAP

La capacidad antioxidante total de las muestras de miel se determinó por medio del ensayo desarrollado por Benzie y Strain (1996). Para la determinación se colocaron 100 µL de la muestra o su respectiva dilución y se agregaron 0,9 mL de reactivo de FRAP recién preparado. Los resultados se expresaron como µg Trolox/mg de miel. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

Ensayo de ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de ABTS se realizó según la técnica de Re et al. (1999). Se colocaron 12 µL de la muestra y 1 ml de solución de ABTS recién preparada. Los resultados se expresaron como µg TRolox/mg de miel. Cada una de las determinaciones se realizó por duplicado.

Análisis estadístico

Se determinaron las mínimas diferencias significativas entre las muestras (LSD) y se compararon los promedios a un nivel de 95% ($p \leq 0,05$) utilizando el test de Fisher. Las muestras se clasificaron de acuerdo a su origen geográfico.

La interdependencia de las variables relacionadas con la capacidad antioxidante (CFT, antioxidantes por DPPH, ABTS y FRAP) se evaluó por medio de un análisis de componentes principales. A partir de esta herramienta estadística se pueden construir ejes artificiales (los componentes principales) y obtener gráficos (denominados biplots) que permiten visualizar las observaciones y variables en un mismo espacio, identificando sus asociaciones. En estos gráficos los puntos indican las observaciones y las variables son graficadas como vectores desde el origen. Si la dirección de una observación se corresponde con la dirección de una variable, entonces se puede interpretar que esa observación presenta valores altos de esa variable. Por otro lado, el biplot también ofrece información sobre la relación entre las variables de acuerdo a los ángulos entre los vectores que las representan: ángulos de 90° entre dos variables indican que éstas no están correlacionadas, mientras que ángulos de 0° indican que las variables están fuertemente correlacionadas en forma postiva (de igual modo, un ángulo de 180° indica que las variables están correlacionadas de manera negativa) (Balzarini et al. 2008).

Adicionalmente se realizó un análisis discriminante lineal (LDA por sus siglas en inglés) para comprobar si es posible discriminar las muestras según su origen geográfico a partir de las variables analizadas. Este análisis permite la representación de las observaciones en un espacio en donde las diferencias entre los grupos son máximas (Balzarini et al. 2008).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software estadístico Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La miel es considerada una importante fuente de antioxidantes con numerosas propiedades beneficiosas (Gheldof y Engeseth, 2002). Los efectos terapéuticos de la miel en muchos casos se han relacionado con la

presencia de antioxidantes, como compuestos fenólicos y flavonoides (Alvarez-Suarez et al. 2013). Otros autores, también han indicado que la capacidad antioxidante de las mieles podría estar relacionada con el contenido de minerales, ya que podrían actuar como donores de electrones (Chua et al. 2013, Sant'Ana et al. 2012).

En el presente trabajo se determinó el contenido de antioxidantes de mieles argentinas recolectadas en las distintas regiones mediante las técnicas de ABTS, DPPH y FRAP. Además se el CFT se evaluó mediante la técnica de Folin-Ciocalteau. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Contenido de antioxidantes y CFT en mieles argentinas medidos por distintas técnicas

	CFT (µg gálico/g)	ABTS (µg Trolox/mg)	DPPH (µg TROLX/mg)	FRAP (µg TROLX/mg)
Patagonia Andina	825,3±166,6[b]	0,60±0,2[b]	0,29±0,15 [b]	0,41±0,17[b]
Buenos Aires Talar	821,5±160,2[b]	0,35±0,2[a]	0,27±0,12 [ab]	0,43±0,16[b]
Buenos Aires Oriental	601,6±72,3[a]	0,18±0,1[a]	0,15±0,04[a]	0,19±0,06[a]
Buenos Aires Paranaense	760,2±151,6 [ab]	0,32±0,5[a]	0,22±0,04 [ab]	0,34±0,05[ab]

Supraíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente (P >0,05).

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de antioxidantes determinado por las técnicas de ABTS, FRAP y DPPH ($P \leq 0,05$). Por otro lado, el ensayo de Folin-Ciocalteu, también mostró diferencias significativas en el CFT entre mieles de distintas zonas ($P \leq 0,05$). En general el mayor contenido de antioxidantes pareciera encontrarse en las mieles de la región Andino Patagónica, mientras que las mieles de la región oriental de Buenos Aires, presentaron los menores valores.

El contenido de compuestos fenólicos fue similar al obtenido por nuestro grupo de trabajo en mieles de la provincia de Buenos Aires cosechadas en años anteriores (Patrignani et al. 2016). Por otro lado, el contenido de antioxidantes cuantificado en las mieles argentinas se comparó con valores de referencias bibliográficas. Se encontró que el contenido de compuestos fenólicos fue superior al obtenido por Beretta et al. (2005) en mieles multiflorales de Italia, pero similares (e incluso levemente inferiores) a los obtenidos en mieles portuguesas por Alves et al. (2013). Por otro lado, los resultados de Isla et al (2011) sobre mieles del noroeste argentino, mostraron que en general esas mieles presentaban un contenido de compuestos fenólicos que no superaba los 400 mg de gálico/Kg de miel, valor muy inferior al obtenido en nuestro trabajo.

El contenido de antioxidantes determinado por la técnica de FRAP fue superior al encontrado en mieles de la provincia de Buenos Aires de cosechas anteriores (Patrignani et al. 2016) y superior a los informados en trabajos de mieles de Brasil; pero resultaron ser inferiores a mieles de México (Ruiz-Navajas et al. 2011). Por otro lado, el contenido de antioxidantes determinado por el método de DPPH fue del orden y hasta levemente superior a los valores encontrados por Kuś et al. (2014) en mieles polacas. Finalmente, al comparar los valores obtenidos con los publicados por Ciappini et al. (2013) en mieles monoflorales de trébol y eucalipto de la región Pampeana Argentina, se encontró que el contenido de antioxidantes por DPPH en las mieles analizadas en nuestro trabajo resultó ser similar a los valores obtenidos por estos autores para mieles de trébol, pero inferiores a los de mieles de eucalipto. Las mieles de la región Andino Patagónica mostraron el contenido de antioxidantes más alto utilizando la técnica de ABTS (se obtuvo un valor de antioxidantes de 0,6 µg equivalentes de Trolox/mg de miel). Para el resto de las regiones el valor osciló entre los 0,35 y 0,18 µg equivalentes de Trolox/mg de miel, sin encontrarse diferencias significativas entre los valores ($p > 0,05$). El contenido de antioxidantes cuantificado mediante esta técnica resultó muy superior a los obtenidos por Chang et al. (2011) en mieles Chinas, aunque fueron inferiores a los establecidos por Ciappini et al. (2013) para mieles monoflorales argentinas. La variabilidad del contenido de antioxidantes en mieles puede deberse a distintos factores, no sólo a su procedencia geográfica, sino también al procesamiento, la manipulación y el almacenamiento (Frankel et al. 1998). Los resultados encontrados en este trabajo indicarían que a pesar de las diferencias encontradas en muestras del mismo origen geográfico, el contenido de antioxidantes podría ser un indicador de la procedencia de las mismas, especialmente en mieles de la Patagonia Andina. Para una mejor interpretación de los resultados se evaluó la interdependencia de las variables relacionadas con la capacidad antioxidante descriptas en la bibliografía por medio de un análisis de componentes principales. El gráfico Biplot obtenido se puede observar en la **Figura 2**.

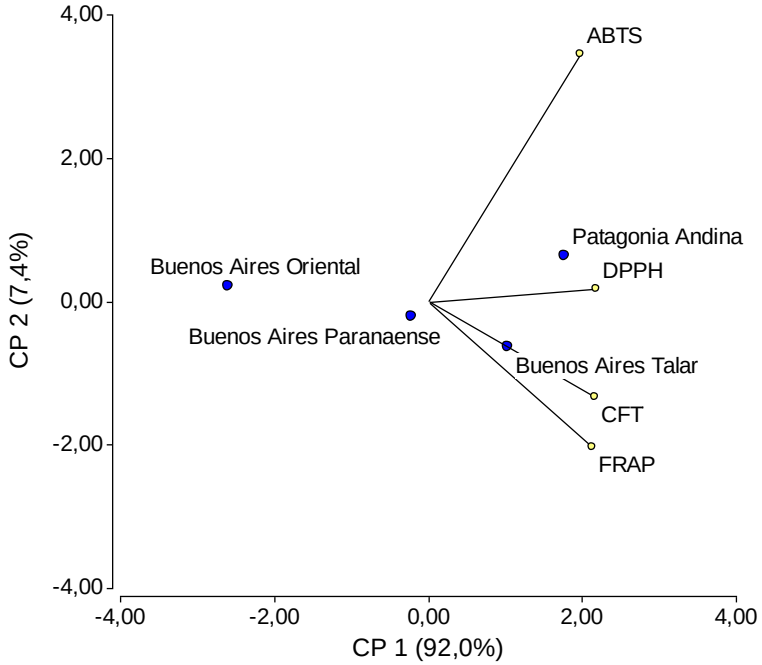


Figura 2. Biplot de componentes principales del contenido de antioxidantes (DPPH, FRAP, ABTS) compuestos fenólicos totales (CFT) en mieles de la región de la provincia de Buenos Aires (región Oriental, Talar, Paranaense) y de la Patagonia Andina.

El componente principal 1 (CP1) concentró el 92,0% de la variabilidad, mientras que el componente principal 2 (CP2) concentró el 7,4% de la variabilidad; esto significa que con las dos primeras componentes es posible explicar el 99,4 % de la variación total. Tal como se puede ver en el Biplot las mieles de la Patagonia Andina se caracterizaron por su capacidad antioxidante determinada con la técnica de ABTS y DPPH. Mientras que las mieles de la región del Talar se caracterizaron por su contenido de compuestos fenólicos (CFT) y su poder antioxidante determinado con la técnica de FRAP.

Para evaluar la correlación entre las variables se calcularon los coeficientes de Pearson que representan una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las variables (Balzarini et al. 2008). La matriz de correlaciones entre variables se puede ver en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Coeficientes de correlación entre parámetros antioxidantes

	DPPH	ABTS	CFT	FRAP
DPPH	1			
ABTS	0,9	1		
CFT	0,96*	0,8	1	
FRAP	0,96*	0,75	0,99*	1

* Correlaciones significativas ($p \leq 0,05$)

Se encontraron excelentes correlaciones entre el poder antioxidante medido por las técnicas de FRAP y DPPH ($r = 0,96$; $p \leq 0,05$) a pesar de que estos dos ensayos se fundamenten en distintos mecanismos.
Además, las técnicas de DPPH y FRAP se relacionaron con el contenido de compuestos fenólicos en la muestra medidos por la técnica de Folin. Los compuestos fenólicos presentes en la miel serían capaces

entonces de actuar como antioxidantes estabilizando los radicales libres (como el DPPH), y también actuando como donores de electrones (para reducir el Fe (III) a Fe (II) en el ensayo de FRAP). Sin embargo, la capacidad antioxidante de las mieles determinada por el ensayo de ABTS no mostró una correlación significativa con el CFT. Esto estaría indicando que, los compuestos fenólicos no son los únicos responsables de la actividad antioxidante observada en las mieles. Probablemente existan otros compuestos (como pueden ser minerales) que también contribuyen a la actividad antioxidante, y que se refleja principalmente en la capacidad antioxidante medida por la técnica de ABTS.

Finalmente se utilizó un LDA para encontrar las ecuaciones que mejor discriminen entre muestras de distintas regiones. La primera dimensión (CV1) acumulaba el 71% de la varianza, mientras que la segunda dimensión (CV2) el 23 % de la misma. Las ecuaciones encontradas con las variables originales fueron las siguientes:

$$CV1 = 1{,}49-0{,}41\ DPPH+14{,}46\ ABTS-0{,}0046\ CFT-0{,}43\ FRAP$$

$$CV2=4{,}25-1{,}42\ DPPH-0{,}48\ ABTS+-0{,}0025\ CFT\ -0{,}77\ FRAP$$

En la **Tabla 3** se puede ver la tasa de error aparente de discriminación, obtenidas al clasificar las observaciones en los posibles grupos a partir de las funciones discriminantes construidas.

Tabla 3. Tasa de error aparente en la clasificación de las muestras de miel aplicando las ecuaciones desarrolladas en el LDA

Grupo	Buenos Aires Oriental	Buenos Aires Paranaense	Buenos Aires Talar	Patagonia Andina	Total	Error(%)
Buenos Aires Oriental	6	0	0	0	6	0
Buenos Aires Paranaense	1	3	2	0	6	50
Buenos Aires Talar	0	2	4	0	6	33,33
Patagonia Andina	0	0	0	6	6	0
Total	7	5	6	6	24	20,83

Tal como se puede ver en la **Tabla 3**, de las cuatro regiones analizadas, las mieles de la región de de Buenos Aires Oriental y Patagonia Andina podían ser bien caracterizadas por su capacidad antioxidante y CFT. Sin embargo, las mieles de la región Parananese y Talar serían indistinguibles. Esto probablemente se deba a que la flora de ambas regiones suele ser similar debido a sus condiciones climáticas. Para confirmar esto sería necesario un análisis palinológico de las mieles.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicarían que el contenido de antioxidantes en mieles podría ser un indicador de la procedencia geográfica de las mismas.

El análisis de componentes principales indicó que las mieles recolectadas en la Patagonia Andina se caracterizaron por contenido de antioxidantes cuantificados con la técnica de ABTS y DPPH. Mientras que las mieles de la región del Talar se caracterizaron por su contenido de compuestos fenólicos y su poder antioxidante determinado con la técnica de FRAP.

El análisis de correlación entre variables indicó que los compuestos fenólicos no son los únicos responsables de la actividad antioxidante observada en las mieles. Probablemente existan otros compuestos (como podrían ser minerales) que también contribuyen a la actividad antioxidante. Esto se refleja principalmente en la

capacidad antioxidante medida por la técnica de ABTS.
A partir del análisis discriminante lineal se pudo concluir que las mieles de la región de de Buenos Aires Oriental y Patagonia Andina podían ser bien caracterizadas por su capacidad antioxidante y CFT.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Suarez J, Giampieri F, Battino M. 2013. Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. Current Medicinal Chemistry, 20: 621-638.
Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo JA, Robledo CW. 2008. Infostat. Manual del Usuario.Córdiba, Editorial Brujas. Pág 336
Benzie IF, Strain J J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.
Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Analytica Chimica Acta, 533:185-191.
Bertha Baldi Coronel (2010). La miel. Una mirada científica. Concordia Entre Ríos, Editorial UNER. Pp 232
Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset, C L. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28: 25-30.
Chua LS, Rahaman NLA, Adnan NA, Eddie TT.2013. Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 1-8
Ciappini MC, Stoppani FS, Martinet R, Alvarez MB.2013. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. Revista de Ciencia y Tecnología, 19: 45-51..
da Silva PM., Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food Chemistry, 196, 309-323.
Escuredo O, Míguez M, Fernández-González M, Seijo MC. 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. Food Chemistry, 138: 851-856.
Estevinho L, Pereira A P, Moreira, L, Dias LG, Pereira, E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food and Chemical Toxicology, 46: 3774-3779.
Frankel S, Robinson G E, Berenbaum MR.1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. Journal of Apicultural Research, 37: 27-31.
Gheldof N, Engeseth N J. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3050-3055.
Isla MI, Craig A, Ordoñez R, Zampini C, Sayago J, Bedascarrasbure, E., ... Maldonado L.2011. Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. LWT-Food Science and Technology, 44, 1922-1930.
Kuś PM, Congiu F, Teper D, Sroka Z, Jerković I, Tuberoso, C I. 2014. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. LWT-Food Science and Technology, 55: 124-130.
Patrignani M, Lupano C E, Conforti, PA. 2016. Color, cenizas y capacidad antioxidante de mieles de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, 115: 77-82
Plan estratégico apícola. 2016 [en línea] consultado el 3/02/2016. Disponible en: http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/producciones_regionales/00_origen_animal/00_apicultura/_publicaciones/plan_estrategic apicola.pdf
Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine, 26: 1231-1237.
Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Zaldivar-Cruz J M, Kuri V, Pérez-Álvarez J Á. 2011. Antioxidant activity of artisanal honey from Tabasco, Mexico. International Journal of Food Properties, 14:

459-470.
Sant'Ana LDO, Sousa JP, Salgueiro FB, Lorenzon MCA,Castro, RN.2012. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. Journal of Food science, 77:135-140.

Efecto de la temperatura de cocción sobre el desarrollo de antioxidantes en galletitas

Patrignani M [(1)], Lupano CE[(1)]

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT La Plata CONICET, CIC, 47 y 116, La Plata, Bs.As., Argentina . mariela_patrignani@hotmail.com

RESUMEN

Durante las últimas etapas del pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) se generan compuestos con una importante capacidad antioxidante. En el presente trabajo, se analizó el desarrollo de productos de Maillard, totales y solubles (obtenidos luego de una extracción en medio acuoso) en galletitas semidulces. Las galletitas fueron horneadas a 100°C y 150°C utilizando distintos tiempos de cocción (20/40/60/80 y 6/10/14/18 minutos respectivamente para cada temperatura). Sobre los productos obtenidos se determinó el color (L*, a*, b*) y parámetros relacionados al pardeamiento no enzimático (ΔE, BI y YI). La actividad de los antioxidantes, tanto solubles como totales, se determinó mediante las técnicas de FRAP y DPPH. Los resultados indicaron que el uso de altas temperaturas durante el horneado de galletitas favorece la generación de compuestos de Maillard solubles e insolubles con actividad antioxidante. Además la proporción de antioxidantes solubles/insolubles depende del tratamiento térmico aplicado al producto. Estos ensayos muestran la importancia de realizar un estudio integral de los antioxidantes presentes en la muestra, no solamente sobre los extractos acuosos sino también sobre el residuo insoluble.

Palabras clave: Antioxidantes, Maillard, Tratamiento térmico, Galletitas.

ABSTRACT

The antioxidant activity of melanoidins, formed at the final stages of Maillard reaction (MR) has attracted much attention in recent years. In the present work, the development of MR compounds with antioxidant activity was evaluated on biscuits prepared at different conditions: 100 and 150ºC (20,40,60 and 80 minutes, and 6,10,14,18 minutes respectively). The color (L*, a*, b*) and the parameters related to the non-enzymatic browning reaction (ΔE, BI y YI) were also determined on the biscuits prepared. The antioxidant amount present in the soluble fraction as well as the total amount of antioxidants in the whole biscuit were considered and quantified. Results showed that the use of high temperature (150ºC) increased the amount of soluble and antioxidant activity in biscuits measured with two different assays (DPPH and FRAP). Besides the soluble/insoluble antioxidant proportion strongly depended on the heating procedure used to cook them. This work demonstrate the importance of conducting a an integral study of antioxidants present in a sample, not only on the aqueous extracts but also on the insoluble residue.

Keywords: Antioxidants, Maillard, Termal Treatment, Bisuits.

INTRODUCCIÓN

Durante el calentamiento los alimentos ricos en proteínas e hidratos de carbono pueden sufrir modificaciones como el pardeamiento no enzimático (caramelización y Maillard). En productos panificados como las galletitas, esto genera que el producto adquiera su color dorado característico y un aroma bien apreciado por el consumidor.

La reacción de Maillard involucra la interacción entre grupos amino de las proteínas con grupos carbonilo, fundamentalmente de hidratos de carbono con capacidad reductora (Van Boekel 1998). La caramelización, por otro lado, requiere condiciones más extremas y sólo involucra la degradación de azúcares (Ramírez-

Jiménez et al. 2001).

La reacción de Maillard es un conjunto complejo de reacciones químicas que tiene lugar entre compuestos con una función amina primaria (α- NH2 terminal, α-NH2 de aminoácidos libres, ε-NH2 de los residuos de lisina, etc.) y compuestos con grupos carbonilo (azúcares reductores como aldosas, ácido ascórbico, vitamina K, ortofenoles, compuestos aromáticos como el aldehído cinámico y la vainillina, aldehídos y cetonas producto de la oxidación de lípidos, etc.) (Lupano 2013). Actualmente el pardeamiento no enzimático es un tema de gran interés, no sólo en la industria alimenticia, sino también en medicina ya que puede tener consecuencias a nivel nutricional y biológico, tanto favorables como negativas (Delgado-Andrade et al. 2010[a]). Sin embargo el nivel de toxicidad de los compuestos de Maillard ha demostrado ser bajo incluso en altas concentraciones, lo que indicaría que los productos de Maillard serían más beneficiosos que perjudiciales para la salud (Taylor et al. 2004).

Uno de los principales aspectos favorables de los compuestos derivados del pardeamiento no enzimático es el poder antioxidante que presentan los productos generados en las últimas etapas. Los estudios de Martin et al. (2009) demostraron que la incorporación de estos compuestos podría proteger al cuerpo del estrés oxidativo. Algunos ensayos han indicado que estos compuestos podrían presentar efectos citotóxicos, pero este efecto ha sido sólo leve en sistemas modelo a altas concentraciones y a tiempos de calentamiento muy prolongados. Se considera que en los alimentos su concentración no es riesgosa, y particularmente las melanoidinas generadas en pan y en galletitas han demostrado no ser tóxicas (Wang et al. 2011).

Existen numerosos trabajos sobre la generación de productos de Maillard en sistemas modelo (Vhangani y Van Wyk 2013, Ruiz-Roca et al. 2008; Hwang et al. 2011), pero pocos sobre sistemas reales, principalmente por la complejidad de las reacciones de Maillard en las matrices alimentarias.

La capacidad antioxidante de los productos panificados ha sido evaluada en el pan y en galletitas preparadas en condiciones de laboratorio (Martin et al. 2009, Delgado-Andrade et al. 2010[b]). Sin embargo, estos trabajos en panificados sólo hacen referencia a los productos de Maillard generados a temperaturas mayores a 180°C (Morales et al. 2009), relacionándose esos trabajos principalmente a la producción industrial.

Actualmente no existe información sobre la generación de estos productos a temperaturas entre 100 y 150°C, y en un horno eléctrico convencional, que sería a nivel "cocina de casa".

El interés particular en los productos de Maillard en panificados radica en que, junto al café, son unas de las principales fuentes de melanoidinas en la dieta. Los estudios de Pastoriza y Rufián-Henares (2014) indicaron que el aporte de antioxidantes provenientes de melanoidinas en la dieta era en primer lugar del café y en segundo lugar de las galletitas, mientras que el pan sólo mostró una modesta contribución. Este factor, sumado a que el consumo de galletitas ha mostrado una fuerte tendencia al aumento no sólo en nuestro país sino también en el mundo (Filipčev et al. 2014) hacen que el estudio de los antioxidantes generados durante la cocción en galletitas sea de gran importancia.

En el presente trabajo, se consideró además que existen productos de Maillard tanto solubles como insolubles (Serpen et al. 2007). La proporción de estos compuestos depende del tipo de alimento y su procesamiento. En productos como el café las melanoidinas son principalmente solubles ya que se encuentran asociadas a ácidos como el clorogénico. Según la bibliografía, en productos de panadería, la mayor parte son insolubles ya que se asocian a las proteínas del gluten formando lo que se conoce como "melanoproteínas" (Gökmen et al. 2009) y se han señalado como parte de la fibra dietaria (Serpen et al. 2007).

Considerando esto, el objetivo de este trabajo fue valuar el desarrollo de productos de Maillard con capacidad antioxidante en galletitas mediante distintas técnicas. Determinar el aporte de antioxidantes totales y solubles presentes en galletitas horneadas a distintas temperaturas y evaluar el desarrollo del color con la durante la cocción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ingredientes

Harina de trigo (Favorita 000, Molinos Río de la Plata, Buenos Aires, Argentina), almidón de maíz

(Maizena, Unilever de Argentina S.A., Buenos Aires), leche en polvo descremada (SanCor, Sunchales, Santa Fe, Argentina), aceite de girasol alto oleico (Propia, Lezama, Buenos Aires, Argentina), sacarosa (Ledesma, Jujuy, Argentina), clara de huevo en polvo (Ovobrand S.A., Bransen, Argentina) y polvo para hornear (Royal, KraftFoods, Argentina).

Preparación de galletitas

Se prepararon galletitas con 35 g de harina de trigo, 25 g de almidón de maíz, 20 g de leche en polvo descremada, 10 g de clara de huevo en polvo, 12,5 g de azúcar, 0,9 g de polvo para hornear, 10 g de aceite de girasol alto oleico y 25 ml de agua potable.

Los ingredientes secos se colocaron en el recipiente de una batidora Philips Cucina (Sao Pablo, Brasil) con el utensilio formador de masa. El aceite se agregó en tres fracciones, mezclando 1 minuto a velocidad 1 (711 rpm) después de cada agregado. Luego se incorporó el agua en dos fracciones mezclando dos minutos a velocidad 2 (754 rpm), y finalmente se mezcló por un minuto más a velocidad 1.

Se colocaron las masas en bolsas de polipropileno, se las estiró con palo de amasar hasta obtener un espesor de 0,3 cm y se las dejó reposar por 15 min. La superficie se pinchó con un rodillo especial evitando así la formación de burbujas grandes de gas durante el horneado. Finalmente se cortó la masa en rectángulos de 3,3 cm de ancho por 5,2 cm de largo con un cortapastas.

Las masas se colocaron sobre una placa de silicona y se llevaron a horno eléctrico (White Westinghouse, W-CG18) para su cocción. Se utilizaron dos condiciones de temperatura de cocción 100ºC y 150ºC Durante la cocción a 100°C se prepararon galletitas con tiempos de horneado de 20, 40,60 o 80 minutos, mientras que durante la cocción a 150°C las galletas se hornearon por 6; 10; 14 o 18 minutos. Para cada una de las condiciones evaluadas se realizaron dos horneadas independientes.

Evaluación del color

El nivel del color generado durante el horneado puede utilizarse como una medida de la extensión de la reacción de Maillard, que es importante en la aceptabilidad del producto, ya que el consumidor responde primero a las características visuales del alimento (Fayale y Gerrard 2002).

Para la medida de los parámetros visuales se utilizó un colorímetro triestímulo Chroma meter CR 300 Minolta, Osaka, Japón). A partir de los parámetros L*, a* y b* se determinó el parámetro BI, ΔE, y Yellowing index (YI) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$BI = \frac{100(X - 0{,}31)}{0{,}17}$$

Donde

$$X = \frac{a^* + 1{,}75\,L^*}{5{,}645\,L^* + a^* - 3{,}01b^*} \quad (1)$$

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

$$YI = 142.86 b^*/L^* \quad (3)$$

El YI ha sido ser utilizado para evaluar la evolución de las reacciones de Maillard en distintos alimentos (Delgado-Andrade et al. 2010c).

Capacidad antioxidante de los productos de Maillard en galletitas

Actualmente no existe un método estandarizado para determinar la capacidad antioxidante de las muestras alimenticias. Es por esto que, para poder llegar a resultados válidos, se utiliza una combinación de métodos.

En el presente trabajo para evaluaron los antioxidantes solubles en agua, que es el solvente más recomendado

en la bibliografía (Budryn et al. 2009). Para cuantificar el contenido de antioxidantes totales se evitó toda extracción, determinando antioxidantes en la muestra total.

Extracción de compuestos antioxidantes

Se extrajeron los compuestos antioxidantes solubles en agua por la técnica de Morales et al. (2009) con pequeñas modificaciones. Las muestras de galletitas se molieron (Molinillo De Café Electrico Peabody Pe-mc9103, China) y tamizaron (500 µm).

Se pesaron 0,2 g de muestra (galletitas o masa) y se agregó 1,5 ml de agua a 45ºC. Luego de 5 minutos de agitación a 1000 rpm las muestras se enfriaron por media hora a 4ºC. Posteriormente, el extracto se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 x g a 4ºC (5415 R Eppendorf, Hamburgo, Germany). El sobrenadante se recogió y se realizaron dos extracciones adicionales utilizando 1 ml y luego 0,5 ml de agua destilada. Los sobrenadantes se juntaron, se los filtró por un filtro de acetato de celulosa (0.45 µm de poro, Osmonics, USA) y se los guardó a -20ºC hasta el momento del análisis.

Actividad antioxidante por DPPH

El 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) es un radical libre, sus soluciones presentan un color violeta con un máximo de absorbancia a 515 nm (Brand-Williams et al. 1995). En presencia de un compuesto antioxidante el DPPH es reducido y su absorbancia a 515 disminuye, observándose una solución amarilla

Se colocaron 0,25 ml de diluciones apropiadas de los extractos de galletitas o masas. Se agregó 1,0 ml de $DPPH^{\bullet}$ (30 ppm en etanol) y se dejó estabilizar en oscuridad durante una hora. Pasado ese tiempo se midió la absorbancia a 515 y se determinó la capacidad inhibitoria de DPPH. Luego este valor se comparó con los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de una curva patrón de Trolox (ácido 6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un análogo de la vitamina E) y los resultados se expresaron como µg equivalentes de Trolox/g de materia seca.

Actividad antioxidante por FRAP

El ensayo FRAP permite medir la capacidad reductora de la muestra sobre el catión férrico (Benzie y Strain 1996). Una vez reducido, el catión ferroso se compleja con el reactivo de FRAP que contiene el ligando tripiridil-triazina (TPTZ). Este complejo de color azul intenso presenta un máximo de absorción a 593 nm.

A 200 µl del extracto se le agregaron 1,8 ml del reactivo de trabajo de FRAP. Este reactivo se prepara en el momento a partir de 2,5 ml de reactivo de TPTZ (10 mmol TPTZ en 40 mmol HCl), 2,5ml de $FeCl_3$ (20 mM) y 25 ml de buffer (300 mM de AcNa y 6mM de HAc, pH 3,6). Una vez iniciada la reacción se dejó reposar durante una hora en oscuridad. Finalizado ese tiempo se midió la absorbancia de la muestra a 593 nm.

Los resultados se expresaron como µg equivalentes de Trolox/g de materia seca. Todas las medidas se realizaron al menos por duplicado.

Determinación de antioxidantes totales

Se colocó en contacto directo la muestra molida con el reactivo de trabajo. Mientras que los compuestos solubles migraban a la solución, los insolubles por medio de una reacción en interfase también reaccionaron a pesar de estar químicamente ligados a moléculas más grandes.

Para la determinación dela actividad antioxidante totale por DPPH se utilizó el método descripto por Serpen et al. (2007) con algunas modificaciones. Las muestras de galletitas fueron molidas y tamizadas (500 µm) para que el solvente pudiera acceder correctamente. Para iniciar a reacción se agregó 1,5 ml de reactivo DPPH (30 ppm en etanol), y se dejó la mezcla de reacción en agitación en oscuridad durante una hora. Finalmente se centrifugaron las muestras 10 minutos a 1000 x g. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 515 nm por duplicado. Los resultados se expresaron como µg equivalentes de Trolox/g de materia seca.

Para obtener la capacidad reductora total de las muestras se realizó mediante el ensayo de FRAP se pesaron cantidades apropiadas de las muestras (masas o galletitas molidas) y se agregaron 1,8 ml del reactivo de trabajo de recién preparado y 0,2 ml de agua destilada. Se agitó la mezcla de reacción por 90 minutos a 1100 rpm. Pasado ese tiempo las muestras se centrifugaron a 15000 × g por 10 minutos.

Los resultados se expresaron como µg equivalentes de Trolox/g de materia seca.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de dos lotes distintos de galletitas se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial o bifactorial según correspondía. Para comparar entre medias se utilizó el test de "mínimas diferencias significativas" (LSD). En ambos casos, el nivel de significación elegido fue del 95%.
Estos análisis se realizaron mediante el software estadístico InfoStat, 2012 (Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Color

El color es un factor clave a la hora de definir la calidad y aceptabilidad de un producto (Lara et al. 2011). Es el primer parámetro que el consumidor percibe y, en productos como los panificados, influye fuertemente la intención de consumo (Purlis 2010).
En las galletitas el color es en gran medida el resultado de una compleja serie de reacciones de pardeamiento no enzimático. La extensión de la reacción de Maillard depende de distintos factores, como la temperatura, la actividad acuosa, el pH, el contenido de humedad y la composición del producto. Durante el tiempo de cocción de las galletitas se midió el color y se determinaron los parámetros relacionados con el pardeamiento no enzimático (**Figura 1**).
El parámetro L* indica la luminosidad, este parámetro disminuye a medida que se generan compuestos oscuros como resultado del pardeamiento durante la cocción. Se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas utilizadas, obteniéndose galletitas más oscuras al utilizar temperaturas de 150°C ($P \leq 0,05$). Al inicio de la cocción no se observaron cambios en el color de las galletitas hasta alcanzados los 14 minutos para las galletitas horneadas a 150°C y los 60 minutos a 100°C.

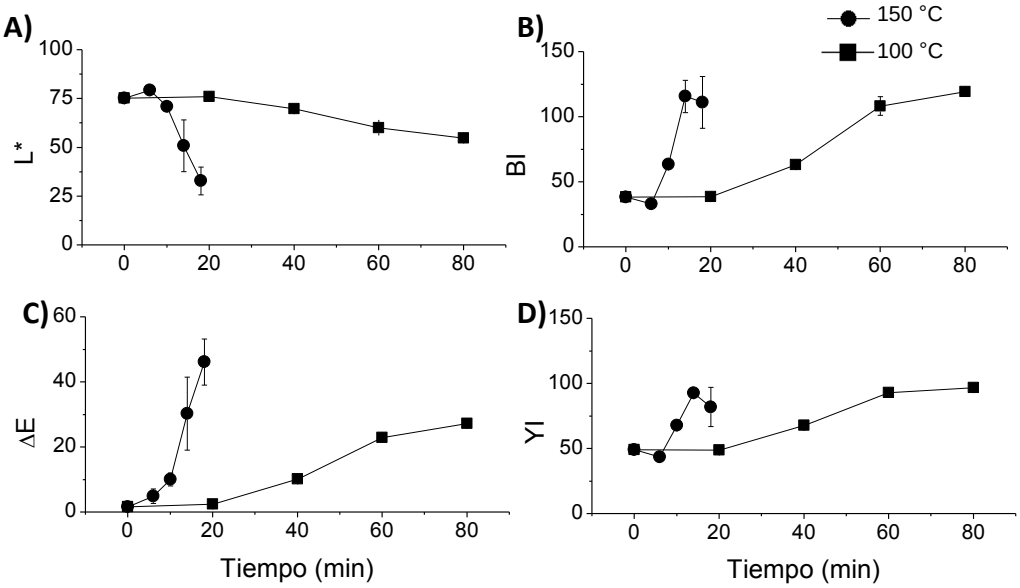


Figura 1. Evolución de los parámetros de color L* (A), BI (B), ΔE (C) y YI (D) en galletitas horneadas a 100°C y a 150°C Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Siguiendo la tendencia de L*, se observó que en los primeros momentos de la cocción el valor de BI no se modificó significativamente ($P > 0,05$). Luego, superados los 10 minutos a 150ºC o los 40 minutos a 100ºC,

el valor de BI aumentó hasta finalmente estabilizarse en un valor de 113,6 ± 4,9 (valor máximo obtenido para ambas temperaturas utilizadas).

El parámetro ΔE indica la distancia entre dos colores en el espacio (Gökmen y Sügüt 2007) y está principalmente influenciado por el parámetro L* (Morales y van Boekel 1998). El aumento de este parámetro con el tiempo de cocción indica una mayor diferencia de color causada por el pardemiento no enzimático. El análisis estadístico mostró que el uso de altas temperaturas generó un producto con una mayor diferencia de color que el obtenido a bajas temperaturas ($P \leq 0,05$). Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en este parámetro para los primeros momentos de la cocción ($P > 0,05$), pero luego el ΔE aumentó significativamente obteniéndose mayores valores con la cocción a 150ºC.

El parámetro YI (yellowing index) se utiliza como un indicador de la intensidad del tostado. Delgado-Andrade et al. (2010c) utilizaron este parámetro para evaluar el desarrollo de las reacciones de Maillard en distintos alimentos. Estos autores encontraron que el uso de tratamientos térmicos severos generaba un mayor valor del YI en productos como carnes y papas fritas. En las galletitas analizadas en el presente trabajo se observó un incremento de este parámetro a los 40 min de cocción a 100°C y a 10 min de cocción a 150°C, hasta finalmente estabilizarse en un valor de 94,2 ± 2,2 independientemente de la temperatura utilizada.

Capacidad antioxidante de compuestos solubles en agua

Sobre el extracto acuoso obtenido y la muestra total se determinó la actividad antioxidante de las galletitas mediante dos técnicas distintas: FRAP y DPPH. Los resultados se obtenidos con el ensayo de DPPH se pueden ver en la **Figura 2**.

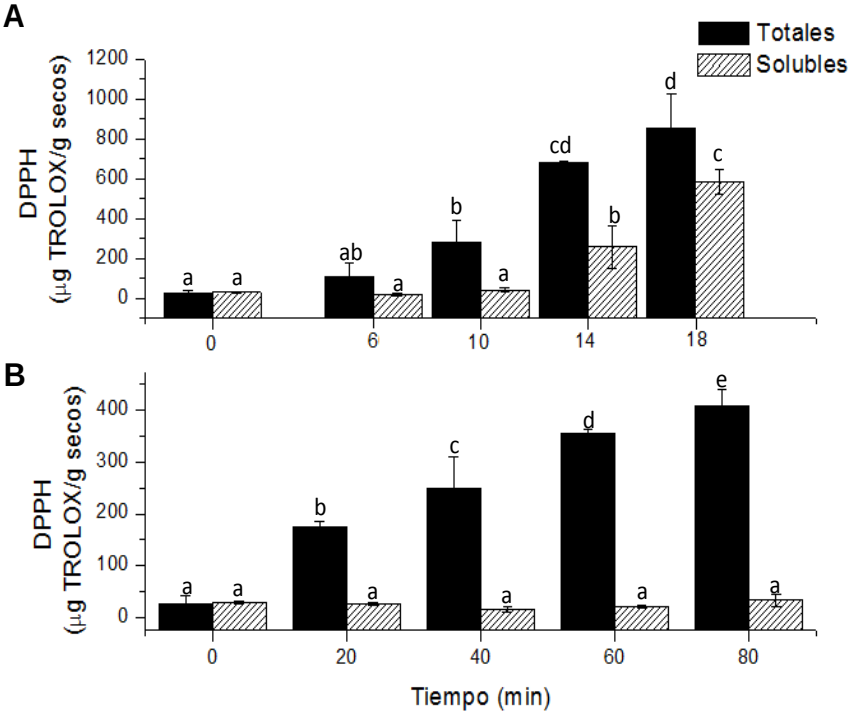


Figura 2. Antioxidantes totales y solubles generados a 150°C (A) y a 100°C (B) medidos por DPPH. Letras iguales indican que las medias no se diferencian significativamente ($P \leq 0,05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

El ensayo de DPPH permite determinar la capacidad de donar hidrógenos en un medio etanólico formando una molécula estable de DPPH-H a partir del radical libre DPPH•.

Los resultados obtenidos sobre los extractos acuosos mostraron que la actividad antioxidante de las galletitas horneadas a 150°C aumentaba significativamente a los 14 minutos de cocción ($P \leq 0,05$). Vhangan y Van Wyk (2013) también encontraron que la actividad antioxidante de sistemas modelo preparados a partir de fructosa-lisina y ribosa-lisina tratadas a alta temperatura (121°C) aumentaba con el tiempo del tratamiento térmico. Estos autores apoyaron la idea que la capacidad antioxidante determinada mediante la técnica de DPPH se debía a la capacidad de los compuestos de Maillard de donar hidrógenos para formar una molécula estable DPPH-H. También podría estar ocurriendo que los polifenoles de la harina de trigo durante tratamientos térmicos severos se liberen y puedan ser más fácilmente extraíbles.

Por otro lado, la actividad antioxidante de las masas puede deberse a los ingredientes utilizados en la formulación. En la harina de trigo blanca se han encontrado compuestos fenólicos en cantidades considerables, aunque significativamente menores que los encontrados en harinas integrales (Gélinas y McKinnon 2006). Por otro lado, la leche en polvo descremada puede contener antioxidantes como péptidos cortos, proteínas (como la caseína) y, en cierta medida, los compuestos de reacción de Maillard generados durante su procesamiento o durante su tiempo de conservación (Gonzales et al. 2010).

Cuando las galletitas fueron horneadas a 100°C no se observó un aumento significativo en la concentración de antioxidantes medidos por DPPH ($P > 0,05$). Los resultados obtenidos por Vhangani y Van Wyk (2013)

en sistemas modelo mostraron una tendencia similar: estos autores al determinar la capacidad antioxidante de los productos de Maillard preparados a bajas temperaturas (60°C) no encontraron generación de antioxidantes entre los 15 y los 120 min de reacción. Por otro lado, al utilizar temperaturas intermedias (80°C) la actividad antioxidante aumentó al aplicar tiempos de calentamiento de 120 min, pero fue significativamente menor a la actividad antioxidante obtenida al tratar térmicamente a la muestra a 121°C durante el mismo tiempo.

En el ensayo de FRAP el Fe(III) es reducido a Fe(II) por acción de los compuestos dadores de electrones en un medio ácido. En esto caso se encontró que la actividad antioxidante de las galletitas horneadas a 150ºC aumentaba significativamente a los 14 minutos de cocción, y nuevamente no se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante de las galletitas horneadas a 100ºC. Estos resultados se pueden ver en la **Figura 3**.

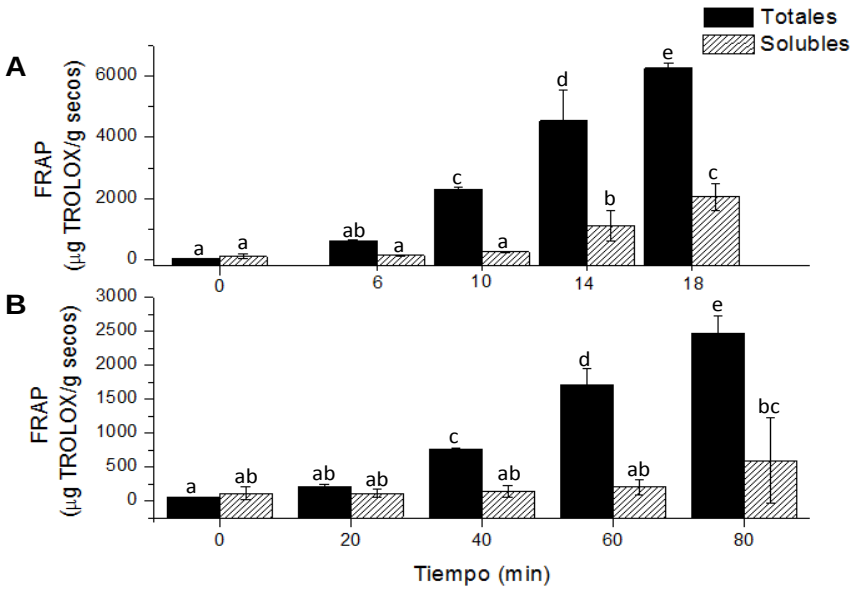


Figura 3. Antioxidantes totales y solubles generados a 150°C (A) y a 100°C (B) medidos por FRAP. Letras iguales indican que las medias no se diferencian significativamente ($P \leq 0,05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

Capacidad antioxidante total en galletitas

Las **Figuras 2** y **3** muestran los resultados obtenidos para los antioxidantes totales presentes en las galletitas. El análisis estadístico mostró que la capacidad antioxidante total aumentaba significativamente con el tiempo de cocción para las dos temperaturas de cocción ($P \leq 0,05$), independientemente de las técnicas utilizadas. Además, en todos los casos la actividad antioxidante total fue superior a la obtenida al realizar la extracción ($P \leq 0,05$), confirmando la presencia de compuestos con actividad antioxidante unidos a la matriz.

El ensayo de DPPH mostró que al utilizar temperaturas de cocción de 100°C aumentaba significativamente la actividad antioxidante a partir de los 20 minutos de cocción. Al utilizar temperaturas de 150°C la capacidad antioxidante también aumentó significativamente una vez superados los 6 minutos de cocción. A esta temperatura también se encontró un valor máximo de capacidad antioxidante entre los 14 y los 18 min de cocción, obteniéndose un valor muy superior al obtenido a 100°C.

Al comparar la relación entre antioxidantes solubles y totales se encontró que en las galletitas analizadas, un tratamiento térmico menos severo incrementa la proporción de compuestos con actividad antioxidante insolubles, medidos por la técnica de DPPH. Serpen et al. (2007) también determinaron la proporción de

antioxidantes de melanoidinas solubles e insolubles en sistemas modelo, pero sus resultados no fueron coincidentes con los obtenidos en este trabajo. Estos investigadores encontraron que un tratamiento térmico más severo aumentaba la proporción de antioxidantes insolubles por sobre los solubles, probablemente por el aumento en el peso molecular de las melanoidinas. Sin embargo, estos autores utilizaron glicina y glucosa para realizar los ensayos y la generación de compuestos de Maillard es fuertemente dependiente de los sustratos. En un sistema real como el de las galletitas durante el horneado pueden existir distintas reacciones paralelas que modifiquen la proporción de antioxidantes solubles y totales.

Al evaluar lo capacidad antioxidante total mediante la técnica de FRAP se encontró que la actividad antioxidante aumentó significativamente a partir de los 10 minutos o 40 minutos, para temperaturas de cocción de 150 o 100°C, respectivamente. Sin embargo, en este caso no se encontró que la actividad antioxidante se limitara por un prolongado tiempo de calentamiento (**Figura 3**).

Cuando se comparó capacidad antioxidante de los extractos solubles y total, se encontró una tendencia similar a la obtenida con el ensayo de DPPH: el tratamiento térmico a 100°C incrementó la proporción de antioxidantes totales mientras que la capacidad antioxidante de los extractos acuosos no aumentó significativamente durante el tratamiento térmico.

Estos resultados confirman la presencia de antioxidantes insolubles que serían biológicamente activos. Aunque, no pudieran atravesar la mucosa intestinal para ser absorbidos (por estar covalentemente unidos a la matriz del alimentos) podrían captar compuestos radicalarios presentes en el tracto intestinal relacionados con el origen de cáncer de colon (Serpen et al. 2007; Pastoriza et al. 2011)

CONCLUSIONES

Los resultados en de presente capítulo muestran que el uso de altas temperatura durante el horneado de galletitas favorecería la generación de compuestos de Maillard con actividad antioxidante.

Además se puede ver que las galletitas modifican su color, volviéndose más oscuras (menores valores de L*) mientras que los parámetros ΔE, BI y YI aumentan. El desarrollo del color depende de la temperatura de cocción utilizada, aunque los parámetros BI y YI presentan un máximo independientemente del tratamiento térmico aplicado.

El uso de temperaturas de cocción de 100°C genera una mayor proporción de antioxidantes insolubles que el uso de temperaturas de 150°C. Estos ensayos muestran la importancia de realizar un estudio integral de los antioxidantes presentes en la muestra, no solamente sobre los extractos acuosos sino también sobre el residuo insoluble ya que estos compuestos también podrían tener un efecto antioxidante durante su tiempo de permanencia en el tracto digestivo, a pesar de no ser absorbidos.

BIBLIOGRAFÍA

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 28; 25-30.

Budryn G, Nebesny E, Podsędek A, Żyżelewicz D, Materska M, Jankowski S, Janda B. 2009. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. European Food Research and Technology, 228: 913-922.

Delgado-Andrade C, Conde-Aguilera JA, Haro A, de la Cueva S, Rufián-Henares J Á. 2010b. A combined procedure to evaluate the global antioxidant response of bread. Journal of Cereal Science, 52: 239-246.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Haro A, Castellano R, Navarro MP. 2010c. Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. Food Chemistry, 122: 145-153.

Delgado-Andrade C. Morales F J, Seiquer I, Navarro MP. 2010a. Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. Food research international, 43: 1304-1311.

Fayle SE, Gerrard JA. 2002. The Maillard Reaction (Vol. 5). Belton P.S. Ed Royal Society of Chemistry. Gran Bretaña

Filipčev B, Šimurina O, Bodroža-Solarov, M. 2014. Quality of gingernut type biscuits as affected by varying fat content and partial replacement of honey with molasses. Journal of Food Science and Technology, 51: 3163-3171

Gélinas P, McKinnon CM. 2006). Effect of wheat variety, farming site, and bread-baking on total phenolics. International Journal of Food Science & Technology, 41: 329-332.

Gökmen V, Serpen A, Fogliano, V.2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER'approach. Trends in Food Science & Technology, 20:278-288.

Gökmen V, Sügüt I. 2007. A non-contact computer vision based analysis of color in foods. International Journal of Food Engineering, 3(5).

Gonzales AP, Naranjo GB, Leiva GE, Malec LS. 2010. Maillard reaction kinetics in milk powder: Effect of water activity at mild temperatures. International Dairy Journal, 20: 40-45.

Hwang IG, Kim HY, Woo KS, Lee J, Jeong HS. 2011. Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar–amino acid model system. Food Chemistry, 126: 221-227.

Lara E, Cortés P, Briones V, Perez M. 2011. Structural and physical modifications of corn biscuits during baking process. LWT-Food Science and Technology, 44: 622-630.

Lupano, C. E. 2013. Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento. Ed. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina

Martín MÁ, Ramos S, Mateos R, Rufián-Henares JA, Morales FJ, Bravo L, Goya L. 2009. Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57:7250-7258

Morales FJ, Martin S, Açar ÖÇ, Arribas-Lorenzo G, Gökmen V. 2009. Antioxidant activity of cookies and its relationship with heat-processing contaminants: a risk/benefit approach. European Food Research and Technology, 228: 345-354.

Morales FJ, Van Boekel MA.1998. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescence accumulation. International Dairy Journal, 7: 675-683.

Pastoriza S, Delgado-Andrade C, Haro A, Rufián-Henares JA. 2011. A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. Food Chemistry, 129: 1926-1932.

Pastoriza S, Rufián-Henares J A. 2014. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. Food Chemistry, 164: 438-445

Purlis E.2010. Browning development in bakery products–a review. Journal of Food Engineering, 99: 239-249.

Ramírez-Jiménez A, García-Villanova B, Guerra- Hernández. 2001. Effect of toasting time on the browning of sliced bread. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 513-518.

Ruiz-Roca B, Navarro MP, Seiquer, I. 2008. Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures: relationships with mineral absorption across Caco-2 cell monolayers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 9056-9063

Serpen A, Capuano E, Fogliano V, Gökmen V. 2007. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 7676-7681.

Taylor JL, Demyttenaere JC, Abbaspour Tehrani K, Olave CA, Regniers L, Verschaeve, L., ... De Kimpe N. 2004. Genotoxicity of melanoidin ractions derived from a standard glucose/glycine model. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 318-323.

Van Boekel M.1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. Food Chemistry, 62: 403-414.

Vhangani LN, Van Wyk J. 2013. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems. Food Chemistry, 137: 92-98

Vhangani LN, Van Wyk J. 2013. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems. Food Chemistry, 137: 92-98

Wang HY, Qian H,Yao, WR. 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. Food Chemistry, 128: 573-584.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET, Argentina) y de la Universidad Nacional de La Plata.

Incorporación de saborizantes naturales a galletitas: efecto sobre el poder antioxidante del producto final

Patrignani M [(1)], Lupano CE[(1)]

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT La Plata CONICET, CIC, 47 y 116, La Plata, Bs.As., Argentina . mariela_patrignani@hotmail.com

RESUMEN

La canela y el chocolate son saborizantes muy utilizados en las galletitas, ambos conocidos además por su capacidad antioxidante. En el presente trabajo se evaluó el efecto de del poder antioxidante de estos ingredientes durante la cocción de galletitas horneadas bajo distintas condiciones (100°C y 150°C durante distintos tiempos). Se determinó el contenido de compuestos fenólicos mediante la técnica de Folin, y el contenido de antioxidantes mediante las técnicas de FRAP, DPPH y ABTS. Se encontró que los saborizantes incorporados incrementaban el nivel de antioxidantes presentes en galletitas horneadas a altas temperaturas (150°C), mientras que su efecto a sobre galletitas preparadas a bajas temperaturas (100°C) fue mínimo. La capacidad antioxidante de las galletitas preparadas con canela fue levemente superior que las preparadas con chocolate. Además se pudo demostrar que, si bien durante la cocción se destruyen parte de los compuestos con capacidad antioxidante, como los compuestos fenólicos, esta pérdida es compensada por la generación de compuestos de Maillard. Se concluyó finalmente que las galletitas preparadas con canela y chocolate son una buena opción para aumentar el consumo de antioxidantes en la dieta.

Palabras clave: Antioxidantes, Canela, Chocolate, Galletitas, Maillard.

ABSTRACT

Cinnamon and chocolate are flavourings widely used in the biscuit industry. Besides, both of them are well known for their antioxidant capacity. In the present work, the antioxidant effect of cinnamon and chocolate during biscuit thermal treatment was studied. Three different formulations were analysed (control, cinnamon and chocolate) and the products were baked under different conditions (100°C and 150°C) the phenolic content and antioxidant content was determined by different techniques (FRAP, DPPH and ABTS). The flavourings incorporated increased biscuit antioxidant activity, especially when high temperature was used to prepare the biscuits (150°C), while only a slight effect was observed when a low cooking temperature was used (100°C). The antioxidant effect of cinnamon was higher than chocolate. Although some of the compounds with antioxidant capacity are destroyed during the cooking procedure, the generation of Maillard reaction compounds compensate this lost.

Keywords: Antioxidants, Cinnamon, Chocolate, Biscuits, Maillard

INTRODUCCIÓN

En América Latina se ha observado un fuerte aumento en el consumo de alimentos ricos en azúcares y grasas; este hecho sumado a la vida sedentaria actual constituye un serio riesgo para la salud de la población (Uauy y Monteiro, 2004). La dieta es un factor clave para el control y desarrollo de enfermedades no trasmisibles. La transición nutricional orientada a una dieta con gran densidad energética, un consumo relativamente elevado de alimentos con alto contenido de grasas saturadas sumado al escaso consumo de frutas, verduras, granos y cereales integrales predispone a la aparición de factores de riesgo y enfermedades como la enfermedades cardiovasculares, colesterol elevado, diabetes, algunos cánceres, osteoporosis,

sobrepeso y obesidad (Elgart et al., 2012; INDEC, 2013). Los patrones de consumo de los argentinos son pobres nutricionalmente, con alimentos poco variados, centrándose en el consumo de trigo, carne vacuna, aceite de girasol y papa. En Argentina se consume menos de la mitad de las raciones recomendadas de verduras, frutas, leche, carnes varias (incluyendo carnes blancas), cereales, legumbres y aceites (Bär, 2010). Entre los alimentos más consumidos por los argentinos, se incluyen las galletitas. Argentina es uno de los principales consumidores de galletitas en el mundo. Un estudio realizado por la consultora Kantar Worldpanel a nivel nacional durante abril del año 2015 mostró que las galletitas dulces son uno de los cuatro alimentos más consumidos en los hogares argentinos (http://www.telam.com.ar). Actualmente en la argentina existen registradas más de 200 tipos distintos de galletitas dulces y aproximadamente 130 tipos de galletas saladas (incluyendo las de agua y las de arroz) (Vademecum Nutringo, 2016). Aunque las galletitas son alimentos que se consumen en gran medida por placer, y están consideradas muchas veces como poco saludables. Su larga vida útil y la posibilidad de incorporar distintos ingredientes, sumado al hecho que se consumen en cualquier momento y lugar, constituyen ventajas que pueden ser aprovechadas para mejorar la calidad de la alimentación de la población. Sin embargo, la estrecha asociación entre los hábitos de consumo y el tipo de galletitas genera limitaciones a la hora de innovar en este tipo de productos y desarrollar productos "más saludables" que sean bien aceptados. Los consumidores de galletitas demandan nuevos alimentos (productos saludables, dietéticos, de conveniencia, etc.) pero que no sean demasiado diferentes a los que consumen tradicionalmente (este efecto se conoce como la "inercia del consumo alimentario") (Acuña y Petrantonio, 2003).

Actualmente en la industria alimentaria existe una creciente demanda por productos saludables. En este sentido son de especial interés los alimentos que contienen antioxidantes, ya que éstos pueden bloquear los efectos de las especies reactivas al oxígeno que conducen a la destrucción de células y generan daños en el ADN (Langner y Rzeski, 2014).

Sería de un gran interés entonces poder desarrollar una galletita más saludable con un alto contenido de antioxidantes pero buena aceptabilidad utilizando productos habitualmente encontrados en el mercado. Entre los saborizantes más utilizados se incluyen la canela y el chocolate, ambos con una importante capacidad antioxidante. La canela molida es un ingrediente habitual en panificados dulces, no solo porque favorece su flavor y su aceptabilidad sino también porque su actividad antimicrobiana prolonga el tiempo de vida útil de los productos (Badei et al. 2002). Por otro lado esta especia ha sido utilizada como digestivo para complicaciones gastroinestinales. Además, por el alto contenido en antioxidantes que tiene la canela se ha relacionado su consumo con un menor riesgo de enfermedades como el cáncer y la arterosclerosis (Gruenwald et al. 2010). El cacao en polvo y el chocolate son un excelente saborizante para productos panificados. Particularmente el cacao en polvo, rico en flavonoides, representa una de las materias primas con mayor presencia en la industria de las galletas (Velásquez et al., 2014). Además, el consumo de chocolate se ha relacionado con la disminución de riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Lamuela-Raventós et al., 2005).

Considerando lo previamente expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene la incorporación de canela y chocolate en sobre el poder antioxidante de galletitas preparadas con ingredientes naturales, libres de aditivos y conservantes y con proteínas de alto valor nutricional (leche y clara de huevo).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ingredientes

Harina de trigo (Favorita 000, Molinos Río de la Plata, Buenos Aires, Argentina), almidón de maíz (Maizena, Unilever de Argentina S.A., Buenos Aires), leche en polvo descremada (SanCor, Sunchales, Santa Fe, Argentina), aceite de girasol alto oleico (Propia, Lezama, Buenos Aires, Argentina), sacarosa (Ledesma, Jujuy, Argentina), clara de huevo en polvo (Ovobrand S.A., Bransen, Argentina), canela en polvo (dos anclas), chocolate en polvo y polvo para hornear (Royal, KraftFoods, Argentina).

Preparación de galletitas

Se prepararon galletitas con 35 g de harina de trigo, 25 g de almidón de maíz, 20 g de leche en polvo

descremada, 10 g de clara de huevo en polvo, 12,5 g de azúcar, 0,9 g de polvo para hornear, 10 g de aceite de girasol alto oleico y 25 ml de agua potable. A la formulación se le agregó 2 g de canela en polvo o chocolate amargo en polvo según correspondía.

Los ingredientes secos se colocaron en el recipiente de una batidora Philips Cucina (Sao Pablo, Brasil) con el utensilio formador de masa. El aceite se agregó en tres fracciones, mezclando 1 minuto a velocidad 1 (711 rpm) después de cada agregado. Luego se incorporó el agua en dos fracciones mezclando dos minutos a velocidad 2 (754 rpm), y finalmente se mezcló por un minuto más a velocidad 1.

Se colocaron las masas en bolsas de polipropileno, se las estiró con palo de amasar hasta obtener un espesor de 0,3 cm y se las dejó reposar por 15 min. La superficie se pinchó con un rodillo especial evitando así la formación de burbujas grandes de gas durante el horneado. Finalmente se cortó la masa en rectángulos de 3,3 cm de ancho por 5,2 cm de largo con un cortapastas.

Las masas se colocaron sobre una placa de silicona y se llevaron a horno eléctrico (White Westinghouse, W-CG18) para su cocción. . Se utilizaron dos condiciones de temperatura de cocción 100ºC y 150ºC. Durante la cocción a 100°C se prepararon galletitas con tiempos de horneado de 20, 40,60 o 80 minutos, mientras que durante la cocción a 150°C las galletas se hornearon por 6; 10; 14 o 18 minutos. Para cada una de las condiciones evaluadas se realizaron dos horneadas independientes.

Extracción

Se extrajeron los compuestos antioxidantes solubles en agua por la técnica de Morales et al. (2009) con pequeñas modificaciones. Las muestras de galletitas se molieron (Molinillo De Café Electrico Peabody Pe-mc9103, China) y tamizaron (500 µm).

Se pesaron 0,2 g de muestra (galletitas o masa) y se agregó 1,5 ml de agua a 45ºC. Luego de 5 minutos de agitación a 1000 rpm las muestras se enfriaron por media hora a 4ºC. Posteriormente, el extracto se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 x g a 4ºC (5415 R Eppendorf, Hamburgo, Germany). El sobrenadante se recogió y se realizaron dos extracciones adicionales utilizando 1 ml y luego 0,5 ml de agua destilada. Los sobrenadantes se juntaron, se los filtró por un filtro de acetato de celulosa (0.45 µm de poro, Osmonics, USA) y se los guardó a -20ºC hasta el momento del análisis. La extracción con agua es la más recomendada por bibliografía cuando existen productos de reacción de Maillard en la muestra (Budryn y col., 2009).

Contenido de fenoles totales

El método de Folin-Ciocalteau fue utilizado para determinar el contenido de fenoles en las muestras. Se agregó agua destilada (2300 µl) y 50 µl del reactivo de Folin a 50 µl de la muestra. Se mezcló por agitación y 2 min después se agregaron 100 µl de Na_2CO_3 20% en NaOH 0,1 M. La mezcla se dejó reposar durante una hora en oscuridad. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro Hitachi U-1900, Tokio, Japón. Paralelamente se realizó una curva patrón con ácido gálico (250 µg/ml) y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/Kg de miel (Escuredo et al. 2013). Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Actividad antioxidante por DPPH

Se colocaron 0,25 ml de diluciones apropiadas de los extractos de galletitas o masas. Se agregó 1,0 ml de una solución recién preparada de $DPPH^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (30 ppm en etanol) y se dejó estabilizar en oscuridad durante una hora. Pasado ese tiempo se midió la absorbancia a 515 y se determinó la concentración de la muestra (en g secos/mL) necesaria para inhibir un 50% de DPPH (IC_{50}) (Brand-Williams et al. 1995). Los resultados se expresaron como $1/IC_{50}$.

Actividad antioxidante por FRAP

A 200 µl del extracto acuoso se le agregaron 1,8 ml del reactivo de trabajo de FRAP. Este reactivo se preparó en el momento a partir de 2,5 ml de reactivo de TPTZ (10 mmol TPTZ en 40 mmol HCl), 2,5ml de $FeCl_3$ (20 mM) y 25 ml de buffer (300 mM de AcNa y 6mM de HAc, pH 3,6). Una vez iniciada la reacción se dejó durante una hora en oscuridad. Finalizado ese tiempo se midió la absorbancia de la muestra a 593 nm (Benzie y Strain 1996). Los resultados se expresaron como µg de Fe^{+2}/g de materia seca. Todas las medidas se realizaron al menos por duplicado.

Ensayo de ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de ABTS se realizó según la técnica de Re et al. (1999). Se colocaron 12 µL de la muestra y 1 ml de solución de ABTS recién preparada. Los resultados se expresaron como µg TRolox/g de muestra seca. Cada una de las determinaciones se realizó por duplicado.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de dos lotes distintos de galletitas se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial según correspondía. Para comparar entre medias se utilizó el test de "mínimas diferencias significativas" (LSD). En ambos casos, el nivel de significación elegido fue del 95%.

Para evaluar la relación entre las variables relacionadas con la capacidad antioxidante (contenido de fenoles totales y antioxidantes por DPPH, ABTS y FRAP) se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Este coeficiente es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables y no depende de las unidades de medida de las variables originales. Asume valores en el intervalo [-1;1] , el signo indica la dirección de la asociación mientras que el valor absoluto mide la fuerza de la correlación. (Balzarini et al. 2008).

Estos análisis se realizaron mediante el software estadístico InfoStat, 2012 (Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos se determinó por la técnica de Folin. En todos los casos se encontró que durante la cocción los compuestos fenólicos disminuían significativamente ($P < 0,05$), este efecto fue más pronunciado cuando se utilizaban temperaturas más altas (de 150°C). Los resultados se pueden observar en la **Figura 1**.

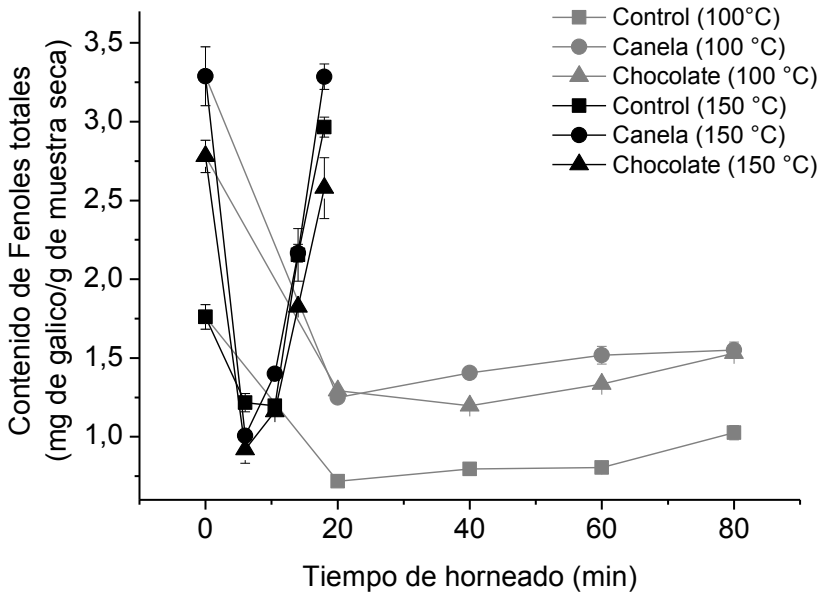


Figura 1. Compuestos fenólicos totales determinados en las galletitas preparadas con distintas formulaciones (control, canela y chocolate) horneadas a distintas temperaturas (100 y 150°C) y distintos tiempos de cocción

Esto demuestra que durante la cocción los compuestos fenólicos presentes en las especias y en las harinas se descomponen por las altas temperaturas. En trabajos anteriores, Roncero Ramos (2014) ya había comentado

que muchos de los antioxidantes presentes en las masas crudas de los productos de panadería son termolábiles y su contribución a la capacidad antioxidante va mermando durante el tratamiento térmico. Sin embargo, superados los 10 min a 150 °C se observa un aumento en el contenido de compuestos fenólicos solubles, probablemente debido a la generación de productos derivados del pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard). A pesar de que a 100°C también ocurriría reacción de Maillard, esta sería mínima. Si bien existen diferencias estructurales entre los compuestos fenólicos y los productos de Maillard como las melanoidinas, el reactivo el reactivo de Folin-Ciocalteu utilizado parecería ser sensible a estos productos. Probablemente porque las melanoidinas también tendrían la habilidad de reducir el reactivo (Pastoriza y Rufián Henares, 2014).

Antioxidantes por ABTS

Esta técnica mostró una alta capacidad antioxidante en las masas, muy superior a la de las galletitas obtenidas después del horneado a 100°C ($P \leq 0,05$), mientras que el horneado a 150°C si bien, también disminuye la capacidad antioxidante del producto a tiempos cortos, la cocción prolongada genera productos de reacción de Maillard que contribuyen a la capacidad antioxidante total de la muestra. Un comportamiento similar fue encontrado en los compuestos fenólicos determinados por la técnica de Folin. Los resultados se pueden encontrar en la **Figura 2**.

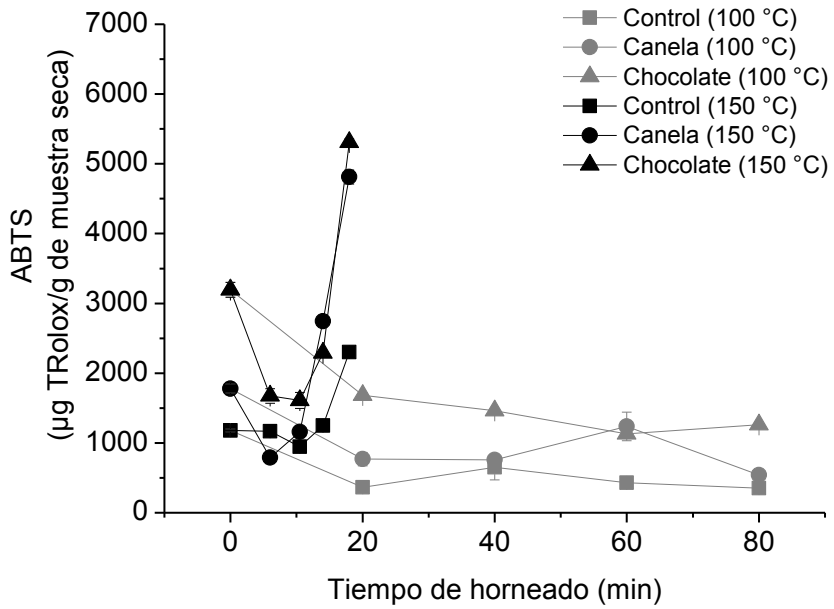


Figura 2. Antioxidantes determinados por la técnica de ABTS en las galletitas preparadas con distintas formulaciones (control, canela y chocolate) horneados a distintas temperaturas (100 y 150°C) y distintos tiempos de cocción

Al comparar los valores de actividad antioxidante de los distintos productos, se puede ver que las masas poseen una actividad antioxidante significativamente superior a la encontrada en casi todas las galletitas (excepto para la cocción a 150°C por 18 min). La actividad antioxidante de las masas sin agregado de especias puede deberse a los ingredientes utilizados en la formulación. En la harina de trigo blanca se han encontrado compuestos fenólicos en cantidades considerables, aunque significativamente menores que los encontrados en harinas integrales (Gélinas y McKinnon, 2006). Por otro lado, la leche en polvo descremada puede contener antioxidantes como péptidos cortos, proteínas (como la caseína) y, en cierta medida, los compuestos de reacción de Maillard generados durante su procesamiento o durante su tiempo de conservación (Zulueta et al. 2009, Gonzales et al. 2010). La alta capacidad antioxidante presente en las

masas con canela probablemente se deba al cinamaldehido mientras que en las masas con chocolate la capacidad antioxidante podría explicarse por la presencia de flavonoides del chocolate, especialmente las epicatequinas (Singletary 2008, Serafini 2003).

Estos resultados indicarían que el ensayo de ABTS es menos sensible a los antioxidantes generados via reaccion de Maillard en galletitas que a los productos compuestos antioxidantes en las masas. Los resultados de Campos-Vega et al. (2015) mostraron la misma tendencia; estos autores encontraron que durante el proceso de tostado del café, la actividad antioxidante del producto determinada mediante la técnica de ABTS disminuía, mientras que el ensayo de DPPH mostraba la tendencia opuesta (generación de antioxidantes durante el calentamiento).

Antioxidantes por DPPH y FRAP

El ensayo de DPPH permite evaluar la presencia de compuestos con capacidad de donar hidrógenos en un medio etanólico formando una molécula estable de DPPH-H a partir del radical libre DPPH•. Los resultados del contenido de antioxidantes, expresados como la inversa de la concentración de muestra (en g secos de productos/mL) necesaria para inhibir el 50% de la actividad del DPPH ($1/IC_{50}$), se pueden ver en la **Figura 3**.

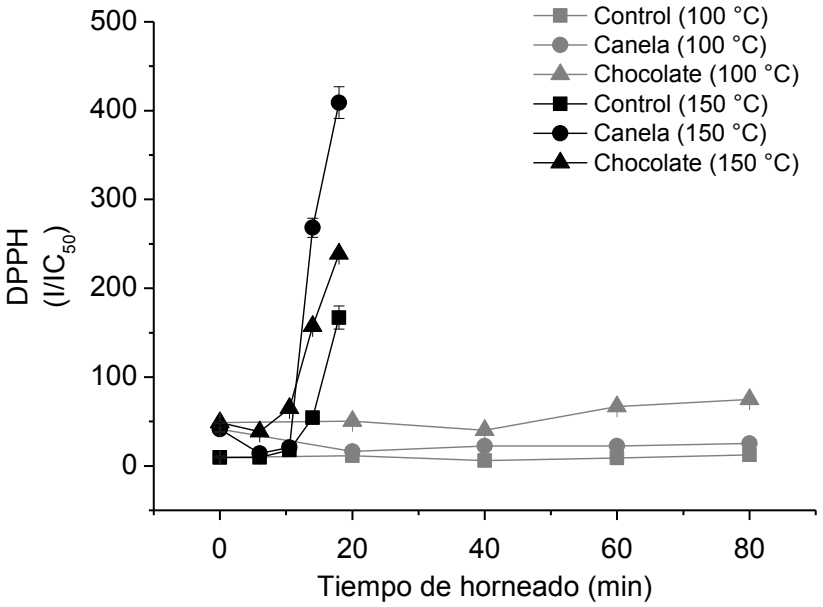


Figura 3. Antioxidantes determinados por la técnica de DPPH en las galletitas preparadas con distintas formulaciones (control, canela y chocolate) horneados a distintas temperaturas (100 y 150°C) y distintos tiempos de cocción

Por otro lado, en el ensayo de FRAP el Fe (III) es reducido a Fe (II) por acción de los compuestos dadores de electrones en un medio ácido. Los resultados de este ensayo se pueden observar en la **Figura 4**.

Aunque estos dos ensayos se basan en distintos fundamentos, es interesante observar que ambos presentaran las mimas tendencias. Estos resultados indicarían que los compuestos antioxidantes presentes en las galletitas actuarían como donores tanto de

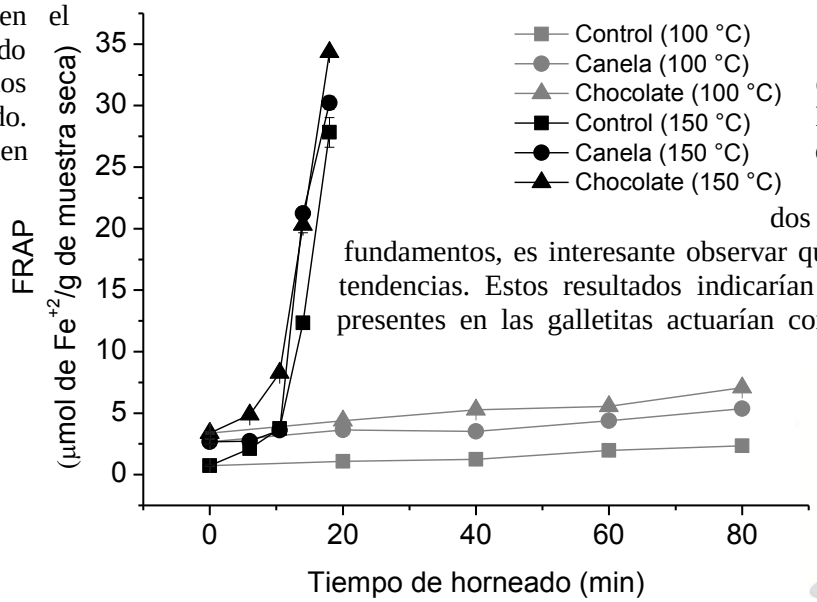


Figura 3. Antioxidantes determinados por la técnica de FRAP en las galletitas preparadas con distintas formulaciones (control, canela y chocolate) horneados a distintas temperaturas (100 y 150°C) y distintos tiempos de cocción

electrones como de hidrógeno.

Se encontraron diferencias significativas en los antioxidantes durante la cocción de las galletitas al utilizar distintas temperaturas ($P < 0,05$). El uso de temperaturas bajas (100°C) no generó un aumento significativo del contenido de antioxidantes en las galletitas. Al comparar estos resultados con el ensayo de Folin en donde se observó un descenso en el contenido de compuestos fenólicos, se podría concluir que el uso de bajas temperaturas de cocción seca el producto y destruye los compuestos fenólicos. Sin embargo, por la cocción estos compuestos con actividad antioxidante son reemplazados con otros que se generan a una velocidad similar, probablemente vía reacción de Maillard (por esto no se ven diferencias significativas en el contenido de antioxidantes durante la cocción).

Por otro lado, el uso de altas temperaturas (150°C), si bien destruye los compuestos fenólicos de las masas, durante la cocción el contenido de antioxidantes presentes en las galletitas aumenta significativa y exponencialmente. Durante el horneado se produce la reacción de Maillard y se generan melanoidinas con una importante capacidad de inhibir los radicales libres (Somoza 2005). Además, la presencia de canela y chocolate en la formulación de galletitas incrementa aún más el poder antioxidante de los productos, siendo el efecto de la canela más pronunciado que el del chocolate.

Correlaciones entre variables

Se evaluó la correlación entre la capacidad antioxidante cuantificada mediante las distintas técnicas (FRAP, ABTS y DPPH) y el contenido de compuestos fenólicos determinados por la técnica de Folin. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Correlaciones de Pearson entre parámetros relacionados con la capacidad antioxidante de las galletitas (ABTS, FOLIN, DPPH y FRAP)

	ABTS	FOLIN	DPPH	FRAP
ABTS	1			
FOLIN	**0,75***	1		
DPPH	**0,87***	0,66	1	
FRAP	**0,85***	0,65	**0,91***	1

*Correlaciones significativas ($P < 0,05$) y $r < 0,7$

Tal como se esperaba se encontró una importante correlación en el contenido de antioxidantes cuantificados por la técnica de DPPH y FRAP ($r = 0,91$). La técnica de ABTS, a pesar de haber demostrado ser poco

sensible a los compuestos de Maillard presentó una buena correlación con los ensayos de DPPH y FRAP (r = 0,87 y r = 0,85 respectivamente). Por otro lado, la técnica de Folin, que es habitualmente utilizada para determinar compuestos fenólicos, mostró una buena correlación sólo con el ensayo de ABTS (r = 0,75). Esto estaría indicando que la actividad antioxidante cuantificada por este ensayo tiene una estrecha relación con la generación de estructuras que además de ser capaces de inhibir al radical libre $ABTS^{*+}$ son también capaces de reducir el reactivo de Folin.

CONCLUSIONES

Estos ensayos indicarían que durante la cocción de galletitas existe una gran variedad de compuestos antioxidantes involucrados, algunos se destruyen y otros se generan. El tiempo y la temperatura utilizada para hornear las galletitas tiene una estrecha relación con el contenido de antioxidantes en las mismas.

Las masas crudas presentan un gran aporte de compuestos fenólicos que se descomponen durante el tratamiento térmico. Sin embargo, un prolongado tratamiento a altas temperaturas parece aumentar el contenido de compuestos sensibles al ensayo de Folin, probablemente por que los compuestos de Maillard también poseen la habilidad de reducir el reactivo. La capacidad antioxidante determinada por la técnica de ABTS presentó una tendencia similar al ensayo de Folin.

Se encontraron tendencias similares en el contenido de antioxidantes cuantificados por la técnica de FRAP y DPPH, aunque se fundamenten en distintos principios. Estos ensayos demostraron que durante el horneado se generan compuestos de Maillard con una importante capacidad de inhibir los radicales libres. Además, la presencia de canela y chocolate en la formulación de galletitas incrementa aún más el poder antioxidante de los productos, siendo el efecto de la canela más pronunciado que el del chocolate.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña AM, Petrantonio M. 2003. La innovación tecnológica como tecnológica como estrategia de desarrollo empresarial: el caso de la industria de galletitas en argentina. Agroalimentaria, 16:13-28.

Badei AZ, El-akel A, Faheid SM, Mahmoud BS. 2002. Application of some spices in flavoring and preservation of cookies: 1-antioxidant properties of cardamom, cinnamon and clove. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 98: 176-183.

Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo JA, Robledo CW. 2008. Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina

Bär N. 2010. La dieta de los argentinos es de baja calidad. La Nación. Disponible en www.lanacion.com.ar/1300821-la-dieta-de-los-argentinos-es-de-baja-calidad (Acceso 20/10/16)

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Brand- Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 28: 25-30.

Budryn, G., Nebesny, E., Podsędek, A., Żyżelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S. y Janda, B. (2009). Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. European Food Research and Technology, 228(6), 913-922.

Campos-Vega R, Vázquez-Sánchez K, López-Barrera D, Loarca-Piña G, Mendoza-Díaz S. Oomah, BD. 2015. Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (Coffea arabica L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. Food Research International, 77: 156-161.

Elgart J, Pfirter G, Gonzalez L, Caporale J, Cormillot A, Chiappe ML, Gagliardino J. (2010). Obesidad en Argentina: epidemiología, morbimortalidad e impacto económico. Rev Argent Salud Pública, 1: 6-12.

Escuredo O, Míguez M, Fernández-González M, Seijo MC. 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. Food Chemistry, 138: 851-856.

Gelinas P, McKinnon CM. 2006. Effect of wheat variety, farming site, and bread- baking on total phenolics. International journal of food science & technology, 41: 329-332.

Gonzales AP, Naranjo GB, Leiva GE, Malec LS. 2010. Maillard reaction kinetics in milk powder: Effect of water activity at mild temperatures. International Dairy Journal, 20: 40-45.

Gruenwald J, Freder J, Armbruester N. 2010. Cinnamon and health.Critical reviews in food science and nutrition, 50: 822-834.

INDEC (2013). 3° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo.
Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/publicaciones/pdf/11.09.2014-tercer-encuentro-nacional-factores-riesgo.pdf. Acceso 6/1/15

Lamuela-Raventós RM, Romero-Pérez AI, Andrés-Lacueva C, Tornero A. 2005. Review: health effects of cocoa flavonoids. Food Science and Technology International, 11: 159-176

Langner E, Rzeski W. 2014. Biological properties of melanoidins: a review. International journal of food properties, 17: 344-353.

Pastoriza S, Rufián-Henares JA. 2014. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. Food chemistry,164: 438-445.

Ramos I R. 2014. Consumo de glicoproteínas del pan: implicaciones en el metabolismo fosfocálcico y óseo. Editorial de la Universidad de Granada.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine, 26: 1231-1237.

Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Zaldivar-Cruz J M, Kuri V, Pérez-Álvarez J Á. 2011. Antioxidant activity of artisanal honey from Tabasco, Mexico. International Journal of Food Properties, 14: 459-470.

Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. 2003. Plasma antioxidants from chocolate. Nature, 424: 1013-1013.

Singletary K. 2008. Cinnamon: overview of health benefits. Nutrition Today,43:263-266.

Somoza V. 2005. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an

update. Molecular nutrition & food research,49: 663-672.
Uauy R, Monteiro CA. 2004. The challenge of improving food and nutrition in Latin America. Food and nutrition bulletin, 25: 175-182.
Vademecum Nutrinfo (2016). Tabla de composición de alimentos www.nutrinfo.com/tabla_composicion_quimica_alimentos.php?FoodId=1334&marca=Chocolinas&FoodCategory=Pan,%20galletitas%20y%20pasteler%C3%ADa&numberOfResults=40&order=Fecha_Carga&desc=DESC&measure=100gr&page=1#label (acceso el 22/05/2016)
Velásquez L, Aredo V, Caipo Y, Paredes E. 2014. Optimización por diseño de mezclas de la aceptabilidad de una galleta enriquecida con quinua (Chenopodium quinoa), soya (Glycine max) y cacao (Theobroma cacao L.).Agroindustrial Science, 4: 35-42.
www.telam.com.ar/notas/201504/103274-pastas-leches-galletitas-dulces-yerba-mate-productos-mas-demandados.html (Acceso 23/10/2016)
Zulueta A, Maurizi A, Frígola A, Esteve M J, Coli R. Burini G.2009. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk.International Dairy Journal, 19: 380-385.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET, Argentina) y de la Universidad Nacional de La Plata.

Characterization of soybean oil and fully hydrogenated palm oil blends

Queirós, M.S.[1*], Paglarini, C.S.[1], Vidal, V.A.S.[1], Ribeiro, A.P.B.[1]

(1) UNICAMP – University of Campinas, Campinas, Brazil.
mayqueiros_18@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el aceite de soja (AS) y el aceite de palma totalmente hidrogenado (APTH), mezclas en función de sus características físicas, estructurales y de composición. Las mezclas se prepararon en las proporciones de 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 y 50:50 (% p/p) APTH:AS. Se determinó la composición en ácidos grasos y triglicéridos (TG), punto de fusión, contenido de grasa sólida, cinética de cristalización, comportamiento térmico, consistencia y microscopía. La adición de APTH ha dado lugar hasta en mezclas compuestas de un mayor contenido de ácidos grasos saturados y TGs trisaturados, y en consecuencia, puntos de fusión más altos. La red de cristales de grasa mostró un contenido de grasa sólida más alto, se hizo más densa y más cristales, es posible relacionar la consistencia, el cual fue evaluado como grasas muy duros, excepto la mezcla de menor contenido de APTH (10:90). Además, el aumento en APTH indujo cambios en el comportamiento térmico, con inicio de la cristalización a temperaturas más elevadas y un intervalo de fusión más amplio, permitiendo que sea diseñado para su uso en los productos a base de grasa.

Palabras clave: aceite de soja, aceite de palma totalmente hidrogenado, mezcla de lípidos, cristalización.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the effect of soybean oil (SO) blends with fully hydrogenated palm oil (FHPO) in their physical, structural and composition characteristics. Blends were prepared in proportions 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 and 50:50 (% w/w) FHPO and conventional SO. The study involved composition of fatty acids and triacylglycerols (TAGs), solid fat content and isotherm crystallization, melting point, thermal behavior, consistency and microscopy. The FHPO addition resulted in blends composed of a higher content of fatty acids and long chain TAGs, higher saturation and higher melting point. Furthermore, the increase in FHPO induces changes in thermal behavior, causing an increase in the induction of crystallization and higher melting range. The network of fat crystals showed a higher solid fat content, became denser and more crystals, it is possible to relate the consistency, which was evaluated as very hard fats, except the blend of lower content of FHPO (10:90). The study allowed to evaluate the addition of different rates FHPO, obtaining blends of denser network, higher melting point, lower liquid oil and greater consistency and may be intended for use in fat-based products.

Keywords: Soybean oil, fully hydrogenated palm oil, lipid blends, crystallization.

INTRODUCTION

Oils and fats are widely used in the food industry, once they have unique properties. The chemical composition determines the physical properties lipids, which, in turn, determine the suitability of this ingredient for in food, since they affect structure, stability, storage and characteristics sensorial foods. Most of the natural oils and fats have limitations of use in certain processes and products due to their composition in differentiated fatty acids and triacylglycerols (Danmodaran et al., 2010).

For this reason, oils and fats are modified by physical or chemical methods to increase their functionality, being carried out, for example, hydrogenation (Ribeiro et al. 2009). The hydrogenation process is the modification of the composition, consistency, structure, reactivity towards oxidation, thermal decomposition

and other chemical reactions (Garcia 2010).
The blend of fully hydrogenated oils, no trans isomers with vegetable liquid oils is considered a strategy to obtain fats with low trans content and with great potential for use in shortenings or margarines. In this case, it is important to adjust the proportion of the solid and liquid blends, because this balance directly affects the texture and functionality of these fats (Garcia 2010, Guedes et al. 2014).
Among the vegetable oils, soybean oil is notable for its desirable characteristics, such as, ease of delivery, nutritional value, economic value and high functionality (Ribeiro et al. 2009). While palm oil is widely used in the food industry, however, there are difficulties in some applications due to their slow crystallization rate and the formation of large agglomerates of crystals (Oliveira et al. 2015). The fully hydrogenated palm oil has a high palmitic acid content, which have a natural tendency to crystallize the β' form, adding crystallization and melting characteristics desirable for some products (Masuchi et al. 2014). Through complete hydrogenation a fully saturated product is obtained which can be used for certain purposes as crystallization inducers. Hydrogenated fat has homogeneous composition of triacylglycerols and high melting point (Oliveira et al. 2015).
The aim of this study was to evaluate the effect of soybean oil (SO) blends with fully hydrogenated palm oil (FHPO) on the compositional, physical and structural characteristics. The results were evaluated by means of composition of fatty acids and triacylglycerols, in solid fat content, melting point, thermal behavior, consistency and polarized light microscopy.

MATERIAL AND METHODS

The soybean oil used was purchased in the local market and the fully hydrogenated palm oil was supplied by Cargill Agricola S/A (Itumbiara, Brazil). Blends were prepared in the proportions of 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 and 50:50 of fully hydrogenated palm oil and soybean oil (% w/w).

Analytical methods

Fatty acid composition

The analysis of fatty acids was performed by capillary gas chromatograph (CGC Agilent 6850 Series GC System), after esterification performed according to the method of (Hartman and Lago, 1973). The methyl esters of fatty acids were separated according to the procedure of AOCS Ce 1f-96 (AOCS 2009) in capillary column DB-23 Agilent (50% Cyanopropyl – methylpolysiloxane), dimensions: 60 m x 0.25 mm x 0.25 mm internal Æ film. The chromatograph operating conditions were: Column Flow = 1.0 mL/min; Linear velocity = 24 cm /s; detector temperature = 280°C; injector temperature = 250°C; oven temperature = 110 - 215°C (5 °C /min), 215°C - 24 min; carrier gas - helium; injection volume = 1.0 mL, split 1:50.
The fatty acids composition in lipid bases was calculated from the chemical composition of the raw materials, considering that the fatty acids composition of the blends represents a linear combination between the SO and FHPO.

Composition of triacylglycerols

The triglyceride compositions were obtained according to the AOCS Ce 5-86 method (AOCS 2009), capillary gas chromatograph (GC Agilent 6850 Series Gc System). The capillary column used was DB-17 HT Agilent Catalog: 122-1811 (50% phenyl - methylpolysiloxane) with dimensions of 15 m, int Ø: 0.25 mm and 0.15 µm film. Split 1:50. The chromatograph operating conditions were: Column Flow = 1.0 mL / min; Linear velocity = 40 cm /sec; Temperature detector: 375ºC; injector temperature: 360°C; Oven temperature: 280-340°C - (2 °C / min) 340°C - 40 minutes; Carrier gas: helium; Injected volume: 1.0 uL, split 1: 100; Sample concentration: 10 mg / mL tetrahydrofuran.
The composition of tryacilglycerols in lipid bases was calculated from the chemical composition of the raw materials, considering that the composition of tryacilglycerols of the blends represents a linear combination between the SO and FHPO.

Solid fat content

Was performed according to the AOCS method Cd 16b-93 (AOCS 2009), tempering, non stabilized fats: Samples were heated for 15 minutes at 100°C, then held at 60°C for 5 min and stabilized by 1 h at 0°C. The

determinations were carried out in series at temperatures of 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 and 55°C. The equipment used was: Mq20 Analyzer Bruker NMR (Nuclear Magnetic Resonance - NMR) and dry bath TCON 2000 in temperature range 0 to 70°C (Duratech, USA).

Melting point

The melting point was obtained for the temperature corresponding to 4% solids content found in the solids profile analysis conducted on NMR (Nuclear Magnetic Resonance) via polynomial equations adjusted with the aid of mathematical software (Karabulut et al. 2004).

Isotherms of crystallization

The samples were melted at 100°C for 15 min and kept in dry bath (TCON 2000 Duratech, Carmel, USA) at 70°C for complete destruction of crystalline history. The increase in solid fat content due to static crystallization was monitored by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Bruker Minispec PC120 (Silberstreifen, Rheinstetten, Germany) with the reading chamber stabilized at 25°C. Data collection was automatic, with measurements every minute for 60 min. Crystallization kinetics were parameterized by the induction time (T_{SFC} - time relative to initiate crystal formation) and the maximum content of solid fat, SFC_{max}. The constants of the Avrami model (Equation 1) were fitted to the experimental data and used to classify the nature of the crystal growth process and quantify the kinetics of crystallization.

$$\frac{SFC}{SFC_{máx}} = 1 - e^{-K*t^n} \quad (1) \qquad t_{(1/2)} = (\frac{ln2}{k})^{\frac{1}{n}} \quad (2)$$

Where n is the exponent Avrami (dimensionless), which indicates the growth mechanism of the crystal, K is a constant Avrami, which represents the rate of crystallization, SFC corresponds to the solid fat content at a given time and SFC_{max} is the value SFC maximum at a given temperature. The crystallization half life, $t_{1/2}$, reflects the magnitude of k and n, according to Equation 2.

Microscopy

The morphology of the crystals was assessed using polarized light microscope (Olympus, model BX 51, San Jose, USA) coupled to a digital video camera (Media Cybernetics, model MicroPublisher 5.0 Mpixel, Bethesda, USA). The samples were previously melted at 100°C in an oven and with the aid of a capillary tube, a drop was placed at the center of a glass slide (100°C) preheated and covered with a cover slip. The slides were kept in an incubator at 25°C for 4 h and then placed on the microscope (model FP82, Mettler Toledo, Columbus, USA). The images were captured by the Pro-Plus Image version 7.0 application (Media Cybernetics, Bethesda, USA), using polarized light at a magnification of 40 times.

Thermal behavior

Thermal analysis of samples was performed by differential scanning calorimetry (DSC) according to method AOCS Cj 1-94 (AOCS 2009). A thermal analyzer Model Q2000 V4.7A coupled to a cooling controller RCS90 (TA Instruments Waters LLC, New Castle, USA) was used. The samples were melted and added 8 to 10 mg in sealed aluminum pan. Another pan empty and sealed aluminum was used as reference. The thermal conditions were used: initial temperature of 80°C for 5 min, cooling to -40°C at rate of 10°C /min, and maintained for 5 min at -40°C and then held for fusion heating -40°C to 80°C with the same rate of 10°C /min. The software TA Universal Analyze V4.7A was used to obtain the curves and the following parameters: time of onset of crystallization temperature; peak crystallization temperature; crystallization enthalpy (ΔH); peak height and final crystallization temperature.

Consistency

The consistency was determined using a texture analyzer TA-XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, UK) coupled to a computer. Samples were first placed in an oven at 100°C until complete melting of the crystals and, then, stored in 50 mL beakers. Etching was done in an incubator at 5°C for 24 h to induce crystallization of the fat and then for 24 h at a temperature reading which was 25°C. A cone angle of 45° was used. The equipment was operated under the following conditions: penetration depth = 10 mm, speed = 2 mm / sec, duration = 5 sec (Campos 2005).

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acid composition

The fatty acid composition determines the quality of oil or a fat that can be related to nutritional value, oxidative stability, melting point and medium crystallization (Medic et al. 2014). The most abundant fatty acid found in soy oil (SO) is linoleic acid (18:2) followed by oleic acid (18:1), palmitic (16:0), linolenic (18:3), and stearic (18:0) (Table 1). While the composition of fully hydrogenated fats (hard fats) is much more homogeneous, as the case of fully hydrogenated palm oil (FHPO), which had 99.74% of saturated fatty acids, of which the majority stearic acid (18:0) and palmitic acid (16:0) (**Table 1**).

The addition of fully hydrogenated fat in soybean oil resulted in a gradual increase in the amount of saturated fatty acids and consequently a reduction in unsaturated.

Table 1. Fatty acid composition (%) of samples (FHPO and SO) and blends.

Fatty acids (%)	**SO**	**FHPO**	**FHPO:SO (%w/w)**				
			10:90	**20:80**	**30:70**	**40:60**	**50:50**
C12:0	0.45± 0.16	0.38±0.27	0.44	0.44	0.43	0.42	0.42
C14:0	0.39±0.17	1.14±0.81	0.47	0.54	0.62	0.69	0.77
C15:0	0.05±0.00	0.05±0.04	0.05	0,05	0,05	0,05	0,05
C16:0	11.32±0.45	44.20±1.59	14.61	17.90	21.18	24.47	27.76
C16:1	0.20±0.11	-	0.18	0.16	0.14	0.12	0.10
C17:0	0.13±0.06	0.14±0.10	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14
C17:1	0.11±0.03	-	0.10	0.09	0.08	0.07	0.06
C18:0	5.20±0.96	53.24±1.53	10.01	14.81	19.61	24.42	29.22
C18:1	25.04±1.51	0.21±0.15	22.56	20.08	17.59	15.11	12.63
C18:2	49.53±2.88	0.05±0.04	44.59	39.64	34.69	29.74	24.79
C18:3	6.29±0.41	-	5.66	5.04	4.41	3.78	3.15
C20:0	0.43±0.00	0.52±0.37	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48
C20:1	0.20±0.01	-	0.18	0.16	0.14	0.12	0.10
C22:0	0.47±0.01	0.07±0.05	0.43	0.39	0.35	0.31	0.27
C24:0	0.18±0.04	-	0.16	0.14	0.12	0.11	0.09
Σ Saturated	18.62	99.74	26.73	34.84	42.96	51.07	59.18
Σ Unsaturated	81.38	0.26	73.27	65.16	57.04	48.93	40.82

Triacylglycerol composition

The physical and functional properties of oils and fats can be understood through the triacylglycerols composition (TAG) (Jahaniaval et al. 2000). **Table 2** shows the individual composition of triacylglycerol of soybean oil (OS) samples, fully hydrogenated palm oil (FHPO) and their blends in different concentrations. For soybean oil TAGs were the predominant POL, PLL, OOL, LLO and LLL corresponding to 56.99% of the total composition. This result is in agreement with SO composition found in the literature (Ribeiro et al. 2009, Gunstone and Harwood 2007). To FHPO showed high concentration of PPS and PSS, corresponding to 81.04%. The TAGs in the quantized samples are classified according to degree of saturation in Figure 1. Soybean oil has a higher content (50.15%) TAG triunsaturated (UUU), while fully hydrogenated fat is 100% trisaturated (SSS), which was consistent to that found in the literature (Masuchi et al. 2014).

Table 2. Individual triacylglycerol (TAG) (%) and carbon number (CN) compositions of samples (FHPO and SO) and blends.

CN	TAG (%)	SO	FHPO	FHPO: SO (%w/w)				
				10:90	20:80	30:70	40:60	50:50
46	MPP	-	0.92	0.09	0.18	0.28	0.37	0.46
48	PPP	-	9.57	0.96	1.91	2.87	3.83	4.79
50	MOL	3.5	-	3.15	2.80	2.45	2.10	1.75
	PPS	-	43.14	4.31	8.63	12.94	17.26	21.57
	PPO	0.11	-	0.10	0.09	0.08	0.07	0.06
	PPL	1.84	-	1.66	1.47	1.29	1.10	0.92
52	PSO	0.93	-	0.84	0.74	0.65	0.56	0.47
	PSS	-	37.9	3.79	7.58	11.37	15.16	18.95
	POO	6.38	-	5.74	5.10	4.47	3.83	3.19
	POL	11.59	-	10.43	9.27	8.11	6.95	5.80
	PLL	15.4	-	13.86	12.32	10.78	9.24	7.70
	PLLn	2.75	-	2.48	2.20	1.93	1.65	1.38
54	SOO	0.92	-	0.83	0.74	0.64	0.55	0.46
	SSS	-	8.47	0.85	1.69	2.54	3.39	4.24
	SOL	6.44	-	5.80	5.15	4.51	3.86	3.22
	OOL	11.92	-	10.73	9.54	8.34	7.15	5.96
	OLL	16.53	-	14.88	13.22	11.57	9.92	8.27
	LLL	16.95	-	15.26	13.56	11.87	10.17	8.48
	LLLn	4.31	-	3.88	3.45	3.02	2.59	2.16
	LLnLn	0.44	-	0.40	0.35	0.31	0.26	0.22

M: Myristic; P: Palmitic; S: Stearic; O: Oleic; Li: Linoleic; Ln: Linolenic.

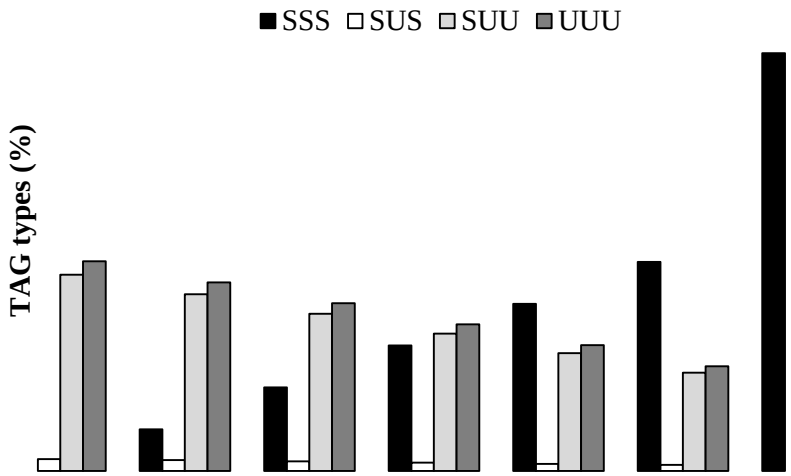


Figure 1. Triacylglycerol (TAG %) types by saturation degree of samples and blends. Triacylglycerols: SSS (trisaturated), SUS (disaturated– monounsaturated), SUU (monosaturated–diunsaturated) and UUU (triunsaturated).

Solid fat content (SFC) and melting point

The solid fat content of the blends was directly related to the concentration of FHPO and SO (**Figure 2**). The increase of the triacylglycerol trisatured content in the blends promoted an increase in solid fat content in all samples. At 10°C the solids were consistent with the concentration of hard fat added, with 12.25, 22.48, 32.62, 43.09 and 53.47% of solid fat concentrations of 10 to 20 30, 40 and 50% fully hydrogenated fat, respectively. In Table 3 it can be observed the melting point of the blends that were extracted from the solids profile with 4% solid fat. The addition of FHPO allowed an increase in melting point and in the solid fat content of the samples, because the hard fat comprises 100% fully saturated TAGs.

Products that show solid fat at temperatures above 35°C are likely to be rejected in a sensory evaluation, they may induce an unpleasant waxy feel in the mouth. But in certain commodity greasy, as some types of fillings for cookies and confectionary, this result is advantageous because at this temperature hardly the product will present free oil exudation (Oliveira et al. 2015).

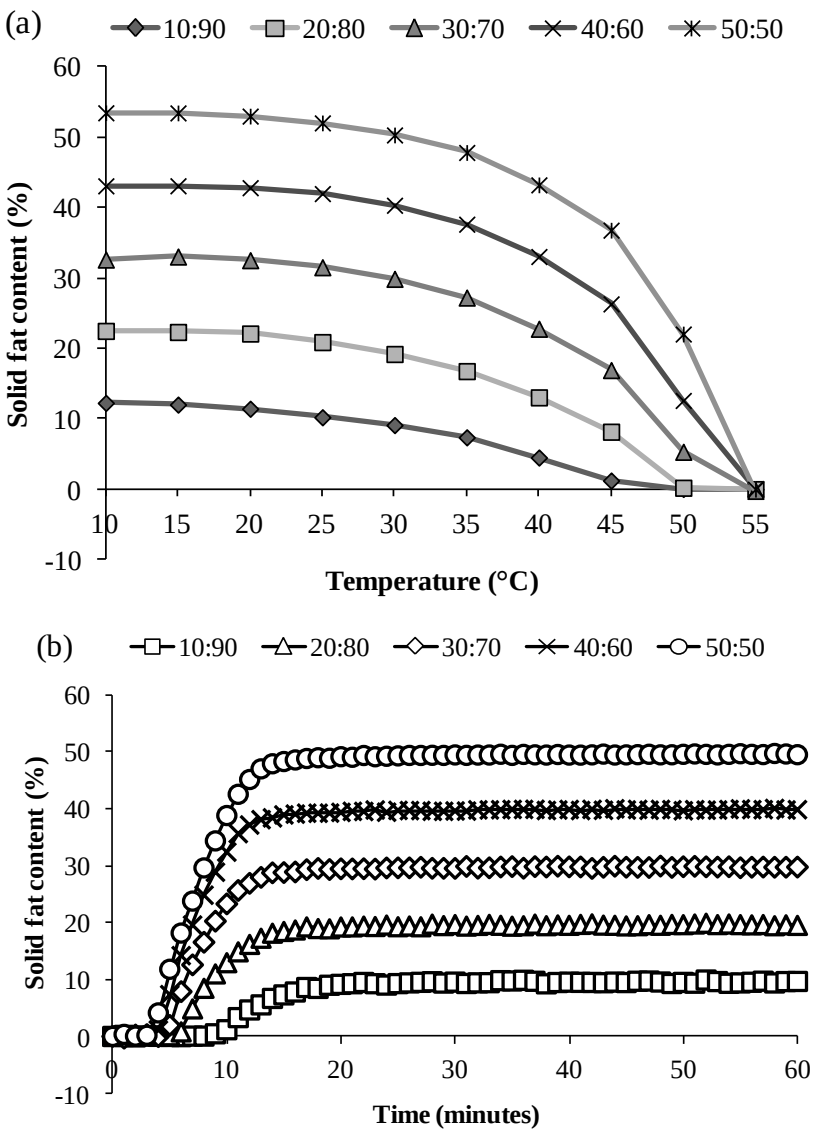


Figure 2. (a) Solid fat content (%) blends of FHPO:SO (w/w); (b) Isothermal crystallization at 25°C of blends of FHPO:SO (w/w).

Isothermal crystallization

The palm oil crystallization has a complex behavior and can generate technological problems into many products with a fat base, and important information about this behavior can be obtained through the crystallization isotherms (Oliveira et al. 2015). In **Figure 2** (b) is the development of the solid fat content (SFC) as a function of time at 25°C for all blends FHPO:SO. It is observed that the higher the hard fat content in soybean oil faster induction occurred to form the first nucleus, which in the graph is represented by the signal output from the base line.

The crystallization process involves three different events: nucleation, crystal growth and maturation of crystals. The induction time (T_{SFC}) is inversely proportional to the nucleation rate. The parameters extracted from the isotherm curves (induction time of the crystals and the maximum amount of solid fat) are shown in **Table 3**.

Also in **Table 3** are the parameters obtained by the Avrami model, by adjusting the experimental data and to

quantify the rate of crystallization (k) and qualify the growth of crystals (n). With the increase in the percentage of hard fat blends, there was an increase in the crystallization rate constant of crystals (k). This result was consistent with the half life crystallization values ($t_{1/2}$).

Table 3. Melting point parameters; induction time (T_{SFC}); maximum content of solid fat (SFC_{max}); Avrami constant (K); Avrami exponent (n); half-life of crystallization ($t_{1/2}$), coefficient of determination (R^2) obtained after static crystallization at 25°C of blends FHPO:SO (w/w).

Blend (FHPO:SO)	**Melting point (°C)**	**T_{SFC} (min)**	**SFC_{max} (%)**	**k ($min^{-n)}$**	**n**	**$t_{1/2}$**	**R^2**
10:90	41.28	10	9.9	3.09E-05	3.9	13.02	0.99
20:80	51.66	7	19.9	3.72E-04	3.4	9.07	0.99
30:70	58.98	5	29.9	7.93E-04	3.3	7.87	1.00
40:60	65.03	4	40.0	1.91E-03	3.0	7.32	1.00
50:50	70.35	4	49.7	3.85E-03	2.6	7.33	1.00

Microscopy

The morphology and structure of fat crystals are related to the crystallization conditions (temperature and cooling rate), as well as the distribution of fatty acids in the TAGs molecules (Oliveira et al. 2015). Images with 40x magnification are shown in **Figure 3**. For these blends with FHPO it was not possible to obtain high-resolution images of the crystals, but you can see that the crystals showed a predominance of spherulitic form in all blends. The Avrami exponent (n), **Table 3**, which is indicative of crystal growth mechanism, the blend 10:90 (FHPO:SO) showed a predominance of spherulitic crystals of sporadic nucleation because according to (Oliveira et al. 2015) values n next four generate this kind of crystal.The 40:60 blends generated instantaneous or sporadic nucleation crystals in nucleation of spherulites or sporadic form of the disk, as described by (Basso et al. 2010). The authors also note that fractional values of n, as in most blends, can be indicative of similar crystals forming morphologies and different types of nucleation and the simultaneous formation of crystals with different morphologies. n values ranging from 2.5 to 4 indicate the presence of a blend of crystal types with flash disk and spherulites or sporadic nucleation (Oliveira et al. 2015), as observed in this study.

The TAGs higher melting point govern the formation of fat crystals, so the blends showed higher hard fat content presented more crystals, a denser network and consequently greater consistency. While the addition of only 10% of hard fat in soybean oil permitted a soft blend by presenting a slightly dense lattice with small crystals and a high liquid fat in the middle, and presents a lower melting point (41.28°C) when compared to other blends.

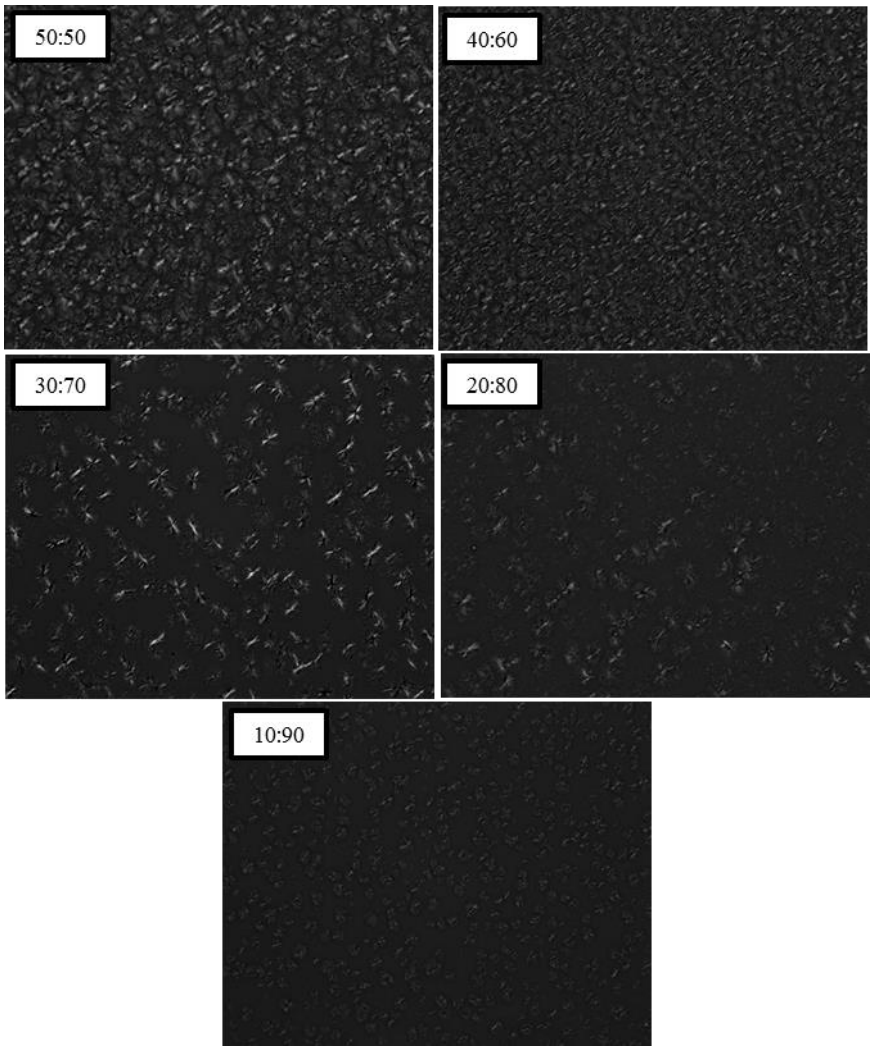


Figure 3. Polarized light microscopy of the crystals at 25°C the blends of FHPO:SO (w/w), 40x magnification.

Thermal behavior

The thermal events blends of FHPO:SO monitored by DSC, provide direct measurements of energy involved in the fusion process and crystallization of fats. In general, the oils and fats may show a complex and highly thermal behavior related to the chemical composition and the method parameters (Ribeiro et al. 2009). Table 4 shows the parameters extracted from the melting and crystallization thermograms of the blends that are found in **Figure 4**.

Blends with higher content of FHPO (40:60 and 50:50) showed just single peak crystallization; already other blends were observed the formation of two peaks. The subdivision of the crystallization curve of a specific oil or fat, exothermic different regions corresponding to different types of TAGs presents in the simple (Tan and Man 2000). The first crystallization peak was the highest intensity and peak temperature ranged from 26.51 to 38.03°C, is represented by more saturated TAGs, such as PPS and PSS. And the second peak had crystallization in the range of -11.42 to -14.71°C, triunsatured, from soybean oil, such LLL and ULL.

Already the melting parameters, all blends showed the formation of two peaks, the former being of smaller area, represented by TAGs that are fused at lower temperatures, in the words, SUU and UUU. Whereas the second peak, was characteristic of higher saturation TAGs, such as SSS. Moreover, the greater the degree of saturation, the higher the enthalpy (ΔH), in the words, the energy dissipated in the second melting peak was

much higher than the first peak for all blends analyzed, and the higher FHPO content was higher melting enthalpy in the second peak, which ranged from 12.02 to 71,43 J/g, for samples 10:90 and 50:50, respectively.

Table 4. Thermal behavior of fusion and crystallization from blends of FHPO:SO (w/w).

Sample	$T_{initial}$ (°C)	T_{peak} (°C)		ΔH (J/g)		Peak height (W/g)		T_{final} (°C)
		Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	
CRYSTALLIZATION								
10:90	27.95	26.51	-11.42	12.3	-6.68	0.614	0.055	-27.25
20:80	32.80	32.20	-13.37	26.88	-6.85	0.962	0.042	-26.75
30:70	36.53	35.39	-14.71	41.86	-6.74	1.071	0.023	-26.25
40:60	39.14	35.83	-	55.56	-	1.258	-	18.00
50:50	41.87	38.03	-	70.85	-	1.548	-	17.63
MELTING								
10:90	-24.51	-16.55	45.09	6.267	12.02	-0.041	-0.114	48.34
20:80	-25.01	-16.23	48.70	5.285	26.30	-0.037	-0.254	52.81
30:70	-24.76	-16.41	51.06	4.517	41.10	-0.033	-0.418	54.93
40:60	-27.62	-16.73	52.98	2.469	55.19	-0.022	-0.575	57.41
50:50	-30.73	-16.60	53.80	2.854	71.43	-0.021	-0.772	58.41

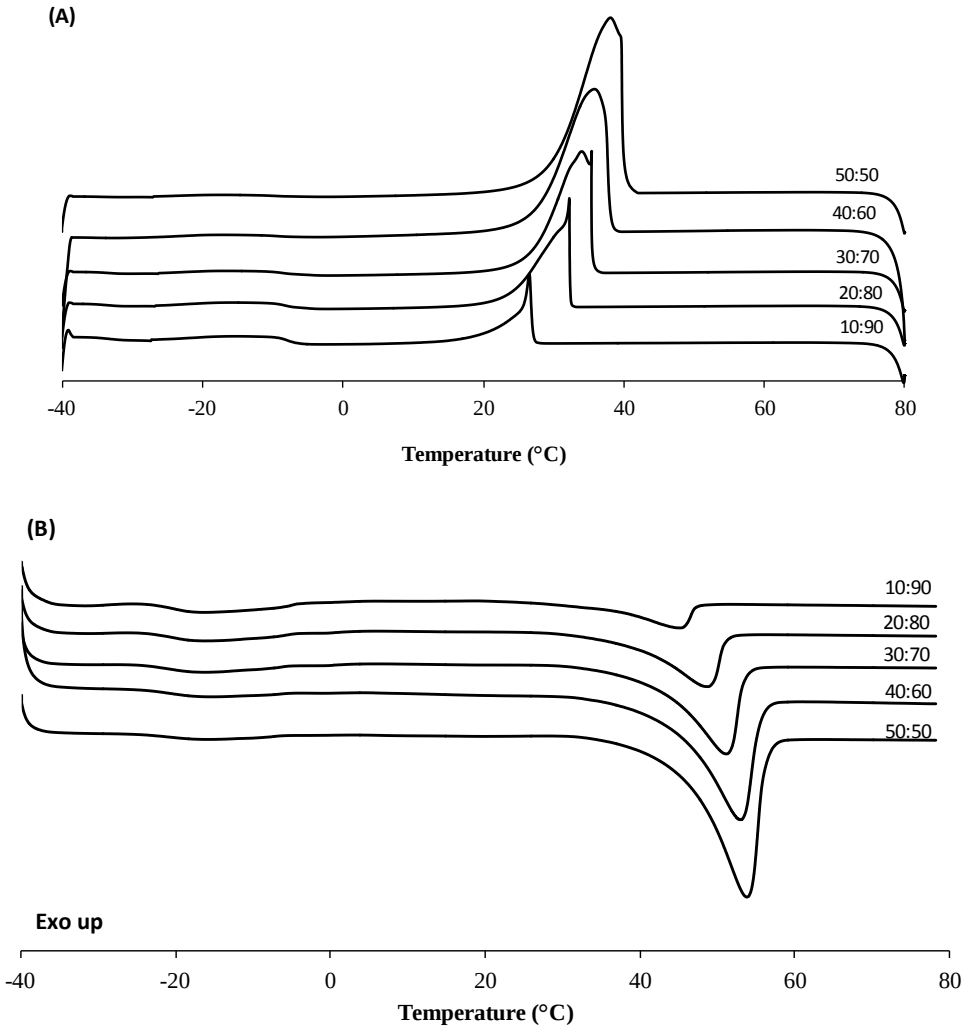


Figure 4. Thermal behavior of crystallization (A) and melting (B) by DSC of blends of FHPO:SO (w/w).

Consistency

The evaluation of the consistency has very important role in the qualification of plastic fats which are characterized as a network of solid fat crystals into a continuous liquid (Oliveira et al. 2015). This plasticity is desirable in many products, allowing proper use under different temperatures, without major changes in consistency (Deman and Beers 1988).

The parameter yield value set by Haighton (1959), is obtained by conversion of penetration data by penetrometer, and corresponds to the fat resistance to deformation, meaning it is, the applied force per unit area capable of causing deformation fat. At 25°C the blends evaluated exhibited consistency ranged from 125.44 to 1881.17 gf/cm², which corresponded to blends 10:90 and 50:50, respectively. Only the blend with minimal content of FHPO may be classified as “soft, already spreadability”, as other fat blends were characterized as “very hard”.

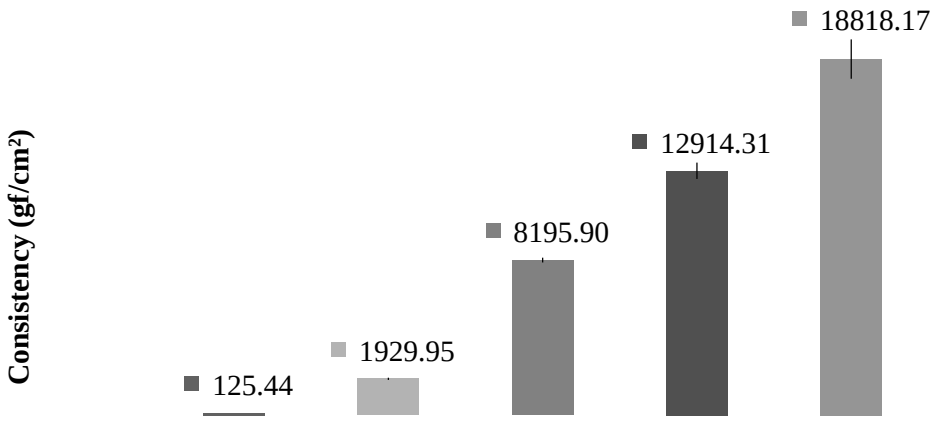


Figure 5. Consistency expressed as a Yield value (gf/cm²) of blends of FHPO:SO (w/w) evaluated at 25°C.

CONCLUSION

The increase in the addition of fully hydrogenated palm oil in the soybean oil induced changes in thermal behavior, causing an increase in melting rate and crystallization, and solid fat content. The addition also generated an increased content of saturated long chain fatty acids and the triglycerides of higher melting point and degree of more di and trinssatured. The network of crystals observed by microscopy showed that the higher content of FHPO, more density and crystals can be observed, which is directly related to consistency.

The 10:90 mixture showed a general purpose technological fat profile, as in margarines and shortenings.

REFERENCES

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

Basso RC, Ribeiro APB, Masuchi MH, Gioielli LA, Gonçalves LAG, Santos AO, Cardoso LP, Grimaldi R. 2010. Tripalmitin and monoacylglycerols as modifiers in the crystallisation of palm oil. Food Chemistry, 122:1185-1192.

Campos R. 2005. Experimental methodology. In: Marangoni AG. Fat crystal networks. Marcel Dekker, New York, pag 267–349.

Danmodaran S, Parkin kL, Fennema OR. 2010. Química de Alimentos de Fennema. 4 a edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

Deman JM, Beers AM. 1988. Fat crystal networks: structure and rheological properties. Journal Texture Study, 18:303-318.

Garcia RKA. 2010. Formulação de gorduras para aplicação em margarinas zero *trans* com redes neurais a partir de gorduras interesterificadas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Guedes AMM, Ming CC, Ribeiro APB, Silva RC, Gioielli LA, Gonçalves LAG. 2014. Physicochemical properties of interesterified blends of fully hydrogenatedcrambe abyssinicaoil and soybean oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 91:111-123.

Gunstone FD, Harwood JL. 2007. Occurrence and characterisation of oils and fats. In FD Gunstone, JL Harwood, AJ Dijkstra. The lipid handbook. 3rd ed. New York: CRC Press. pag. 37–141.

Haighton AJ. 1959. The measurement of the hardness of margarine and fat with con penetrometers. Journal

of the American Oil Chemists Society, 36:345-348.
Hartman L, Lago RC. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab Pract 22:475-476.
Jahaniaval F, Kakuda Y, Marcone MF. 2000. Fatty Acid and Triacylglycerol Compositions of Seed Oils of Five *Amaranthus* Accessions and Their Comparison to Other Oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77:847-852.
Karabulut I, Turan S, Ergin G. 2004. Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oilblends. Euro Food Research Technology, 218:224–229.
Masuchi MH, Gandra KM, Marangoni AL, Sa´Perenha C, Chiu MC, Grimaldi R, Gonçalves LAG. 2014. Fats from Chemically Interesterified High-Oleic Sunflower Oil and Fully Hydrogenated Palm Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 91:859–866.
Medic J, Atkinson C, Hurburgh Jr CR. 2014. Current Knowledge in Soybean Composition. Journal of the American Oil Chemists' Society, 91:363–384.
O'Brien RD. 2004. Fats and oils – formulating and processing for applications. New York: CRC Press.
Oliveira GM, Ribeiro APB, Santos AO, Cardoso LP, Kieckbusch TG. 2015. Hard fats as additives in palm oil and its relationships to crystallization process and polymorphism. LWT – Food Science and Technology, 63:1163-1170.
Oliveira GM, Ribeiro APB, Santos AO, Kieckbusch TG. 2015. Hard fats improve technological properties of palm oil for applications in fat-based products. LWT – Food Science and Technology, 63:1155–1162.
Ribeiro APB, Basso RC, Grimaldi R, Gioielli LA, Santos AO, Cardoso LP, Gonçalves LAG. 2009. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. Food Research International, 42:1153-1162.
Ribeiro APB, Grimaldi R, Gioielli LA, Gonçalves LAG. 2009. Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. Food Research International, 42: 401–410.
Schenck H, Peschar R. 2004. Understanding the structure of chocolate. Radiation Physics and Chemistry, 71: 829-835.
Tan CP, Man YBC. 2000. Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition. Journal of American Oil Chemists Society, 77: 143–155.

ACKNOWLEDGMENTS
The authors would like to thank the Oils and Fats Laboratory of the Department of Food Technology of FEA-UNICAMP for giving space and equipment, and employees and collaborators of discipline by the instrumental analysis and development of this work.

Robustez de la técnica de hidrodestilación y condiciones óptimas para la determinación del contenido en aceite esencial de comino

Quiroga V. del V.[1], Uñates Buenader J.P.[1], Soriano E.M.[1], Fiad S.B.[1], Falaguerra T.[2]

(1) FACEyN-UNCa, Catamarca, Argentina.
(2) CONICET, UNCa, Catamarca, Argentina.
vquirogadb@gmail.com

RESUMEN

Catamarca es la principal productora de comino de Argentina. Evaluar la calidad del comino implica determinar, de manera certera, el contenido en aceite esencial (AE). La Norma ISO/IEC 17025:1999/ IRAM 301:2000 exige, entre otros parámetros de validación de métodos químico-analíticos, la evaluación de la robustez y la identificación de los factores de incertidumbre. Es común leer informes de resultados químicos-analíticos que no precisan las condiciones de trabajo, generando incertidumbre al momento de compararlos. El objetivo fue identificar las variables que intervienen en la hidrodestilación del comino y evaluar la robustez del método para identificar etapas de mayor cuidado que podrían afectar el resultado final. El método se evaluó por el Test Youden-Steiner con un diseño experimental factorial. Se identificaron 7 variables intervinientes y se realizaron 8 experimentos con cinco repeticiones cada uno. Se destiló comino procedente de Tinogasta (2010). Se empleó trampa Clevenger con refrigerante de dedo frío. El AE recogido se expresó en mililitro por 100g de muestra húmeda. Al comparar los resultados se encontró que el método es sensible a la granulometría, al tiempo de destilación y al uso de xileno.

Palabras clave: Youden-Steiner, Hidrodestilación, Clevenger, Validación, Aceite Esencial, *Cuminum cyminum.*

ABSTRACT

Catamarca is the main producer of cumin from Argentina. Evaluate the quality of cumin involves determining, in an accurate way, the essential oil content (AE). The ISO/IEC 17025:1999/ IRAM 301:2000 requires, among other validation parameters of chemical-analytical methods, evaluation of the robustness and identifying factors of uncertainty. It is common to read reports of chemical-analytical results that do not require working conditions, creating uncertainty when comparing them. The aim was to identify the variables involved in hidrodestilación cumin and assess the robustness of the method to identify stages of greater care that could affect the final result. The method was evaluated with a design factorial experimental of Youden-Steiner test. Seven variables were identified. Eight experiments were performed with five repetitions. Cumin from Tinogasta (2010) was distilled. Clevenger trap with cold finger condenser was used. The AE collected expressed in ml per 100g of wet sample. Comparing the results found that the method is sensitive to particle size, the distillation time and the use of xylene.

Keywords: Youden-Steiner, Hydro-distillation, Clevenger, Validation, Essential Oil, *Cuminum cyminum*

INTRODUCCIÓN

Catamarca es la principal productora de comino (*Cuminum cyminum* L.) de Argentina, lo que ha generado interés científico por caracterizar la especia y compararla con la producida en otros lugares del mundo.

El valor condimentico del comino está dado por el rendimiento en esencia y por el porcentaje de aldehído cumínico, siendo éste un componente mayoritario del aceite esencial (AE) y principal responsable de su sabor y aroma característicos (Pérez y Luna 1983, Quiroga y Luna 1999, Tainter y Grenis 1993, Quiroga et

al. 2003).

Factores intrínsecos, como el genotipo o quimiotipo y/o extrínsecos, como condiciones geobotánicas, técnicas de cultivo, cosecha, secado, almacenamiento de la planta aromática y técnica de extracción, influyen en la composición, en la cantidad y en la cuantificación del AE (Bandoni 1989).

El AE de comino se obtiene por hidrodestilación usando la trampa de Clevenger, según la Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society (A.O.C.S.). También la norma ISO 6571:2008, actualmente vigente, especifica un método para la determinación del contenido en AE de especias, hierbas y condimentos basado en la hidrodestilación, sólo que propone una trampa con modificaciones en su arquitectura respecto de los Clevenger de mercado. Si bien, la hidrodestilación es el método que mejor se adapta para la extracción y cuantificación de AE de comino y con el cual se obtiene mejor rendimiento (Bandoni 1989), distintas publicaciones manifiestan su utilización e informan el rendimiento sin precisar las condiciones de trabajo, lo que dificulta la comparación de los resultados generando incertidumbre (C.A.A., 1971; Pérez y Luna 1983; Curioni y Arizio 1997; Iacobellis et al. 2005). Los artículos científicos tampoco reflejan el empleo de la norma internacional ISO 6571:2008. Cuando no se trabaja bajo norma, hay aspectos prácticos de la hidrodestilación que hay que tener en cuenta y controlar para que los resultados sean de calidad.

El rendimiento o contenido en AE se debe informar sobre base seca, por lo que es necesario determinar previamente el contenido de agua de la muestra. Esta determinación está normalizada y se realiza por destilación azeotrópica con tolueno empleando una trampa Dean Stark. En el presente trabajo no se estudia la robustez del método de determinación de humedad, aunque constituye el siguiente objetivo a cumplir en el futuro.

Validar un método de ensayo es documentar su calidad, para lo cual es necesario verificar experimentalmente que el método cumple con los criterios de calidad establecidos por el cliente o usuario. En el proceso de validación, uno de los criterios estadísticos de la calidad exigidos por la Norma ISO/IEC 17025:1999/ IRAM 301:2000 además de la especificidad, veracidad, precisión, límite de detección, linealidad e incertidumbre; es la robustez y la identificación de los factores de incertidumbre.

La robustez es la resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones en el procedimiento. Constituye la evaluación del desempeño del método de ensayo para identificar etapas de mayor cuidado que podrían afectar el resultado final. Un método analítico es robusto si los resultados no son muy sensibles a las variaciones en las condiciones experimentales (Anexo I Codex Alimentarius 2006).

La determinación de la robustez de un método cuando se consideran múltiples factores puede resultar tediosa y hasta impracticable, dado que requiere innumerables ensayos y complicados cálculos estadísticos. Una alternativa aplicable es la prueba de Youden-Steiner, que consiste en introducir varios cambios simultáneos en las condiciones experimentales, de tal manera que puedan determinarse los efectos de los cambios individuales (Youden, Steiner, 1975; INMETRO, 2003). Se puede evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra. Si los resultados son sensibles a las variaciones en las condiciones analíticas, éstas deben ser controladas y especificadas en el procedimiento para garantizar la trazabilidad (Anexo I Codex Alimentarius 2006).

Romero y Quiroga (2014) manifiestan que, a los fines analíticos, para la determinación del rendimiento en AE de comino por hidrodestilación y en base húmeda, es conveniente usar 5 horas de destilación efectiva con una densidad de carga del balón de 0,05g de muestra molida por cada ml de agua. También evidencian cambios sutiles en las composiciones químicas de los AE de comino obtenidos según el número de horas de destilación efectiva empleadas. Estas variaciones se ven reflejadas en los porcentajes de las fracciones hidrocarburo y aldehídica presentes en los AE obtenidos bajo distintas condiciones.

El objetivo de este trabajo fue identificar las variables que intervienen en el proceso de hidrodestilación del comino, analizar cómo influyen en la determinación analítica del contenido de AE y evaluar la robustez del método para identificar etapas de mayor cuidado que podrían afectar el resultado final y proponer las condiciones óptimas de ensayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con cominos limpios procedentes de las localidades Cordobita y El Salado, del departamento Tinogasta, provincia de Catamarca, cosechado en Octubre de 2010 y provistos por los productores. Las muestras de comino de las dos localidades fueron mezcladas para constituir una muestra compuesta que se destinó a los ensayos analíticos. La muestra, perfectamente identificada, fue conservada en el laboratorio en frascos de vidrio limpios y secos, herméticamente cerrados y al resguardo de temperaturas extremas y luz directa.

Selección y preparación de la alícuota para los análisis

Cada alícuota de granos de comino se extrajo por cuarteo de la muestra global. Para los ensayos en los que hubo que destilar comino molido, la molienda se hizo en un molinillo metálico, eléctrico, de alta revolución, instantes antes de cada determinación, cuidando que el proceso sea rápido y evitando el calentamiento del molino. Se molieron porciones de 20g a 25g de comino durante 5 a 8 segundos, cuidando que toda la porción sea molida, aunque sin exagerar para evitar la pérdida de material volátil.

Aparato de destilación y sistema de refrigeración

Se emplearon balones de vidrio de boca esmerilada y de diferentes capacidades de acuerdo a las condiciones de trabajo. Al balón se acopló una trampa de Clevenger con dedo frío como refrigerante. La trampa consta de una escala graduada y una ampolla con robinete para decantar el hidrolato y separarlo del AE extraído. El sistema se calentó con manto calefactor eléctrico. Tanto el balón como el sector de la trampa por donde ascienden los vapores de agua y aceite se cubrieron con paños para evitar reflujo por la condensación prematura de los vapores. Para la refrigeración del sistema se empleó un circuito cerrado en el que la manguera de entrada de agua al refrigerante (dedo frío) se conectó a una bomba de 15watt de potencia sumergida en agua helada contenida en un recipiente de 20L de capacidad. La manguera de salida del refrigerante volvía el agua al recipiente. El montaje de los equipos puede apreciarse en la **Fig 1**. De este modo con sólo 15 o 20L de agua se refrigeraba el sistema durante todas las horas que duraba la destilación. El agua del recipiente se mantuvo fría durante todo el proceso colocando botellas plásticas con agua congelada y renovándolas todas las veces que fueron necesarias.

Figura 1. Equipos en tándem para la extracción de aceite esencial de comino por hidrodestilación con trampa de Clevenger y refrigeración por circuito cerrado.

Medición del AE extraído y cálculo de rendimiento en AE

La lectura del volumen de AE extraído se hace una vez que el sistema está frío. Se lee en la propia escala de la trampa o se recoge el AE en un tubo cónico graduado y se procede a la lectura como se muestra en la **Fig. 2**. El resultado se expresa en “mililitros de AE por 100 g de especia”. Para este estudio de robustez se tuvo en cuenta sólo la determinación de AE en base húmeda.

Figura 2. Tubo cónico graduado empleado para la lectura del volumen de AE recogido tras la destilación.

Evaluación de la robustez mediante la prueba de Youden

La evaluación de la robustez del método de hidrodestilación para la cuantificación del AE contenido en muestras de granos de comino se hizo utilizando el procedimiento propuesto por Youden y Steiner (1975). En base a la experiencia y al examen del método escrito se identificaron 7 variables o factores que posiblemente podrían afectar el resultado final. Cada variable se estudió mediante un valor (o cualidades cuando esto no fue posible) alto (A, B,...,G) y otro bajo (a, b,...,g).

Se llevaron a cabo ocho experimentos con el objeto de determinar la influencia de cada variable en el resultado final. Las variables seleccionadas y los valores asignados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Variables analíticas consideradas y valores asignados para la evaluación de la robustez del método de hidrodestilación para la determinación del contenido de aceite esencial en muestras de comino.

Variable		Valores máximos			Valores mínimos		
A/a	Tiempo de destilación	5 h	-	A	2h	-	a
B/b	Densidad de carga	0,10g/ml	-	B	0,03g/ml	-	b
C/c	Relación de carga	1/2	-	C	1/5	-	c
D/d	Granulometría	Entero	-	D	Molido	-	d
E/e	Régimen	40gotas/min	-	E	10gotas/min	-	e
F/f	Tipo de agua	Potable	-	F	Destilada	-	f
G/g	Empleo xileno	Si	-	G	No	-	g

Definición de las variables

Tiempo de destilación efectiva: Se mide en horas. Se considera destilación efectiva desde el instante que comienza a condensar el destilado en el dedo frío y cae la primera gota hacia la trampa y hasta el instante que deja de condensar luego de apagar el manto calefactor al final del proceso. La variable se mide en horas y para el estudio se le asignaron los valores de A= 5h y a= 2h.

Densidad de carga: Se refiere al cociente entre la masa de muestra de comino y el volumen de agua colocados en el balón de destilación. Se expresa en g/ml. B= 0,10g/ml y b=0,03g/ml

Relación de carga: se refiere a la relación o cociente entre el volumen de agua colocado en el balón de destilación y la capacidad del balón. Se expresa adimensionalmente como fracción o como decimal, por ej. C= 1/2; c= 1/5.

Granulometría: Se refiere al tamaño de las partículas de la muestra a destilar. Toma dos valores, D= grano entero o sin moler y d=grano molido.

Régimen: Debido a la forma del dedo frío acoplado como refrigerante a la trampa de Clevenger, el condensado cae en forma de gotas. El régimen es el número de gotas que cae por minuto y se expresa como gotas/min. E=40gotas/min y e=10gotas/min. Lo que se expresa es el régimen promedio de 5 o más controles que se hacen al proceso de destilación en intervalos de aproximadamente 1hora. Si no se logra estabilizar el régimen, los controles son más frecuentes hasta lograr el régimen de trabajo deseado.

Tipo de agua: la norma ISO 6571:2008 indica el uso de agua destilada, por lo que en la prueba se incluye el agua de red o agua potable. F= agua potable; f=agua destilada.

Uso de xilenos: la norma ISO 6571:2008 indica el uso de xilenos para fijar el aceite volátil y permitir la separación de las fases orgánica y acuosa. Resulta que muchas veces es necesario utilizar el AE medido y extraído para estudiar características físicas como índice de refracción y densidad, y al estar mezclado con xilenos se hace imposible sin una previa separación. Esto nos conduce a estudiar si el uso o no de xilenos influye significativamente en el resultado final de la cuantificación del aceite. G=si, g=no

Los resultados encontrados se representan con las letras s hasta la z. En la **Tabla 2** se muestra el diseño experimental factorial de ocho experimentos que combinan las siete variables para la prueba de Youden-Steiner.

Tabla 2. Combinación factorial de las variables analíticas consideradas para la evaluación de la robustez del método de hidrodestilación por la Prueba de Youden-Steiner.

Variables analíticas		Combinación factorial							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	Tiempo de destilación	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	Densidad de carga	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	Relación de carga	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	Granulometría	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	Régimen	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	Tipo de agua	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	Empleo xileno	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados		s	t	u	v	w	x	y	z

Cada uno de los ocho experimentos se hizo por quintuplicado y cada resultado se expresó como la media de las cinco determinaciones ± la incertidumbre específica. El cálculo de la incertidumbre se hizo para un nivel de probabilidad del 95%.

A partir de los resultados obtenidos se calculó el efecto de cada una de las variables haciendo la diferencia entre la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúsculas) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúsculas). Por ejemplo, para evaluar el efecto del tiempo de destilación (A=5h /a=2h) en el resultado final de los análisis, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto } A/a = (s + t + u + v)/4 - (w + x + y + z)/4 \quad (1)$$

Es decir, la media de los resultados (s + t + u + v) equivalen a "A" porque las seis restantes variables presentes en estos cuatro resultados se anulan entre sí como consecuencia de que existen siempre dos mayúsculas y dos minúsculas de cada variable. Análogamente, la media de los resultados (w + x + y + z) equivalen a "a". Al comparar estos dos valores medios conocemos la influencia de la variable en estudio. Para las demás variables se procedió de igual manera, siguiendo el esquema de la **Tabla 2**.

Estableciendo las siete comparaciones posibles (A – a,...,G – g) puede conocerse el efecto de cada variable. Cuanto mayor sea la diferencia mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. Si cualquiera de estas diferencias entre los promedios de subgrupos de cuatro es mayor que $(2)^{1/2}$ DS entre los replicados llevados a cabo en las mismas condiciones, es indicación de que el método es sensible a los cambios del factor involucrado. Estas variables recibirán especial atención al redactar el procedimiento del método, remarcando la necesidad de un estricto control para obtener resultados de calidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 3** se muestran los resultados obtenidos en los ocho experimentos. Los valores presentados corresponden a las medias de cinco repeticiones con sus correspondientes incertidumbres específicas calculadas para un α =0,05 y un P= 95%.

Tabla 3. Contenido medio de aceite esencial determinado según cada experimento

Variables analíticas		Combinación factorial							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	Tiempo de destilación	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	Densidad de carga	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	Relación de carga	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	Granulometría	D	D	d	d	d	d	D	D

E/e	Régimen	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	Tipo de agua	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	Empleo xileno	G	g	g	G	g	G	G	g
Rendimiento medio en AE expresado en ml%		**(2,3 ± 0,2)**	**(2,0 ± 0,1)**	**(3,6 ± 0,2)**	**(3,9 ± 0,2)**	**(3,2 ± 0,2)**	**(3,8 ± 0,3)**	**(1,7 ± 0,2)**	**(1,4 ± 0,1)**

Para evaluar el efecto de cada variable, al promedio de los cuatro valores correspondientes a los experimentos de los valores altos, para esa variable, se le restó el promedio de los cuatro valores obtenidos en las condiciones mínimas, como se muestra en la ecuación (1). En la **Tabla 4** se presentan los efectos de las variaciones de las variables en los resultados de los análisis.

Empleando los criterios de la prueba de Youden, y como puede verse en la **Tabla 4**, el método de hidrodestilación para la determinación del contenido en aceite esencial de comino, demostró robustez frente a las variables densidad de carga, relación de carga, régimen y tipo de agua. En cuanto a las variables "empleo de xileno" y "tiempo de destilación", mostró ser algo sensible. La mayor variación en el contenido de AE se observó con la manipulación de la variable granulometría y fue de -1,7 ml%. Esto indica que la sensibilidad del método es alta frente a esta variable. El signo negativo señala que el rendimiento en AE es menor cuando se trabaja con comino entero que cuando se lo hace con comino molido. El grano entero, al ser una estructura protectora de lo que está en su interior, dificulta la capacidad extractiva del método y por consiguiente se cuantifica menos AE de lo que realmente contiene la muestra. Si bien esto era de esperar, por cuanto la molienda al romper las glándulas en las que se encuentran alojados los aceites genera que éstos pueden evaporarse más fácilmente, hay textos que en el procedimiento de destilación hablan de granos enteros o partidos (Muñoz 1996).

Tabla 4. Efectos de las variables analíticas en la cuantificación del aceite esencial de comino.

Efecto		Aceite esencial ml% (*)
Tiempo de destilación	(A= 5h; a=2h)	3,0 – 2,5 = **0,5**
Densidad de carga	(B= 0,10 g/ml; b= 0,03 g/ml)	2,8 – 2,7 = **0,1**
Relación de carga	(C= ½; c= 1/5)	2,7 – 2,8 = **-0,1**
Granulometría	(D= entero; d= molido)	1,9 – 3,6 = **-1,7**
Régimen	(E= 40 gotas/min; e= 10 gotas/min)	2,8 – 2,7 = **0,1**
Tipo de agua	(F= potable; f= destilada)	2,7 – 2,8 = **-0,1**
Empleo xileno	(G= si ; g= no)	2,9 – 2,6 = **0,3**

(*) Promedio de los valores obtenidos en condiciones altas y promedio de los valores obtenidos en condiciones bajas.

La manipulación de las variables tiempo de destilación y empleo de xileno, arrojaron diferencias de 0,5 y 0,3ml% respectivamente. Aunque estas variaciones de rendimiento nos sugieren que el método es poco sensible a estas variables, si se desea resultados de calidad, se deberían controlar. En estos casos las diferencias con signo positivo indican que el rendimiento en AE es mayor cuando se destila 5h en lugar de 2h y cuando se emplea xileno para fijar el AE. Cuando el uso del xileno para cuantificar el AE comprometa trabajos posteriores, como las determinaciones de índice de refracción o de densidad, o interfiera en ensayos de bioactividad, podría eliminarse sin el riesgo de generar diferencias significativas en la medición.

En cuanto a las variables densidad de carga y régimen, se obtienen rendimientos en AE levemente mayores cuando se trabaja con valores altos, aunque las diferencias parecen no ser significativas. Un régimen alto, si bien puede conducir a pequeños aumentos en la performance extractiva, genera riesgo de pérdida de material volátil si la refrigeración en el dedo frío no es óptima. Un calentamiento excesivo para aumentar el régimen podría producir escape de vapores en la parte superior de la trampa, donde encaja el dedo frío, por generarse más vapor de lo que el refrigerante puede condensar. Otra consecuencia negativa del sobrecalentamiento es la emulsificación del AE en el agua ya condensada en la trampa, lo que dificulta la separación y deteriora la calidad del AE. Una densidad de carga muy alta puede generar un sobrecalentamiento de la muestra en el

balón y deteriorar el aceite o hacer fracasar el análisis.
Si en cambio miramos las variables relación de carga y tipo de agua, se advierte diferencias de -0,1 en los rendimientos, lo que se interpreta que una relación de carga alta y el uso de agua potable disminuyen el rendimiento en AE, aunque tampoco de manera significativa.
De este estudio se advierte que para lograr un mayor rendimiento extractivo de la hidrodestilación habría que combinar adecuadamente las condiciones de trabajo y cuidar las variables a las cuales el método es sensible.

CONCLUSIONES

De este estudio se puede concluir que el método de hidrodestilación aplicado para la determinación del contenido de aceite esencial en granos de comino es robusto para las variables densidad de carga, relación de carga, régimen y tipo de agua. Por el contrario, el método es sensible a la variable granulometría y se recomienda destilar la muestra molida. Otro factor que se debe cuidar es el tiempo de destilación efectiva, aunque se debe hacer un balance económico por el gasto energético que implica aumentar las horas de destilación. En este caso se recomienda destilar durante 4 horas, como lo indica la norma ISO 6571:2008 y no cinco como se realizó en las condiciones extremas de los ensayos de este estudio

El uso de xileno debe ser evaluado según conveniencia. Si lo que se espera de la aplicación del método es sólo cuantificar el aceite esencial, entonces se recomienda emplear xileno para obtener un resultado más exacto. Si por el contrario, lo que se pretende es cuantificar el aceite y luego recogerlo para usos o estudios posteriores, se recomienda no emplear xileno, dado que la diferencia en el resultado no sería significativa y su posterior eliminación generaría gasto y trabajo adicionales.

La combinación de las condiciones de hidrodestilación que conducirían a un mayor rendimiento extractivo del método son:

Destilar muestra molida, durante 5 horas, agregando xileno a la trampa, empleando agua destilada, con una densidad de carga alta, una relación de carga baja y con un régimen de condensación alto.

Por otro lado, si lo que se busca es lograr un equilibrio entre un buen rendimiento extractivo del método y conveniencia de orden práctico y económico, las condiciones óptimas de trabajo serían:

Destilar muestra molida, durante 4 horas, sin xileno agregado a la trampa, empleando agua potable o de red, con una densidad de carga de 0,05g/ml, una relación de carga de 1/3 o 1/2 y con un régimen de condensación medio de 20 a 30 gotas/min).

En todo informe, ya sea técnico o científico, deberían especificarse las condiciones precisas de trabajo para que los resultados sean comparables.

BIBLIOGRAFÍA

Bandoni A, Juárez M, Mizrahi I. 1989. Contribución al estudio de las esencias de comino (*Cuminum cyminum* L.), Anuales de SAIPA, 32-49.

Código Alimentario Argentino Actualizado - C.A.A., 1971- Capítulo XVI, correctivos y coadyuvantes, art. 1217, substancias aromatizantes, art. 1300.

Comisión del Códex Alimentarius 2006. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del CODEX sobre métodos de análisis y toma de muestras 27a reunión Budapest (Hungría), 15 – 19 de mayo de 2006. Proyecto de directrices para la evaluación de los métodos de análisis aceptables observaciones de los gobiernos en el trámite 6 (Chile, Venezuela) Anexo I.

Curioni A, Arizio O. 1997. Plantas Aromáticas Medicinales Umbelíferas. Buenos Aires, Argentina. Ed. Hemisferio Sur S.A.

ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCMAS/ccmas27/ma2703bs.pdf. Consultada: 20 Octubre 2016.

http:// www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/35331/180907/ consultada 11 junio 2015.

Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F. 2005. Antibacterial Activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. Essential Oils. J. Agric. Food Chem, 53 (1): 57-61.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, março de 2003. Available at: < http://www. inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos /CGCRE/DOQ/DOQCGCRE-8_02.pdf> consultada: 01 julio 2015.

Muñoz F.1996. Plantas Medicinales y Aromáticas: Estudio, Cultura y Procedencia. España. Edit. Aedos S.A.

Norma ISO 6571:2008. Especias, condimentos y hierbas. Determinación del contenido en aceite volátil (método de hidrodestilación).

Norma ISO/IEC 17025- IRAM 301:2004. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de

ensayo y calibración.
Pérez A, Luna C. 1983. Composición del aceite esencial de comino de Pomán (provincia de Catamarca). Anuales de SAIPA- III Congreso Nacional de Recursos Naturales Aromáticos y Medicinales. VIII: 115-120.
Quiroga V, Luna G, De la Quintana L, Vergara A, Fiad S, Amaya S, Altamirano S, Martínez S. 2003. Valor Condimenticio de Semillas de Comino Procedentes de Pomán, Ennegrecidas por la Lluvia Previa a la Cosecha. R. Ciencia, 1: 283-300.
Quiroga V, Luna G. 1999. Parámetros físico-químicos en comino molido que produce Catamarca. Trabajo Final de Licenciatura Inédito. FACEN-UNCA, Catamarca.
Romero E, Quiroga V. 2014. Condiciones de destilación que influyen en el rendimiento extractivo y composición química del aceite esencial de comino. Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial, 55. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCa.
Tainter D, Grenis R. 1993. Especias y Aromatizantes Alimentarios. Zaragoza, España. Ed. Acribia S.A.
Youden W J, Steiner EH. 1975. Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 88 p.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo se pudo hacer gracias a los subsidios recibidos por el proyecto SPU, Convocatoria Jorge Sábato – 2014 y por el proyecto de Ciencia y Técnica de la UNCa. También va nuestro agradecimiento a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNCa por facilitarnos los medios para desarrollar nuestra actividad investigativa.

Características viscoelásticas, textura y color en geles de clara de huevo nativa bajo condiciones alcalinas

Ríos R. S. [1, 2], Appella E. S.[3], Aguerre R. J.[1,2] y Farías M.E.[2,4]

(1) Dpto. de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, Argentina.
(2) Dpto. Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Argentina.
(3) Becaria CIN 2015 - UNNOBA. silvina759@gmail.com
(4) CIC Pcia. de Bs. As.

RESUMEN

Huevo Pidan se hace sumergiendo huevo de pato en solución de 5% de NaOH, 4% de NaCl y 0,4% de $CuSO_4$ a temperatura ambiente por 4 - 5 semanas. El objetivo fue analizar el efecto de las sales NaCl o KCl en las características viscoelásticas, texturales y color de geles de clara de huevo formados por álcali. Los barridos de frecuencia mostraron que los geles alcalinos de clara fueron geles fuertes ($G' > G''$) con un grado de dependencia G' con la frecuencia de aproximadamente 0,16. El perfil de textura reveló, geles con KCl mayor dureza (3,72 10^3 N) y resilencia (71,2 %) que geles con NaCl (1,74 10^3 N y 58,6%) y sin sales (1,67 10^3 N y 50,4%). Los geles fueron poco adhesivos y de alta cohesividad. Los parámetros de color (a y b) presentaron cambios con la presencia de las sales y no difirió la luminosidad, entre geles con NaCl y sin sales ($p > 0,05$). Se concluye que el KCl afectó la gelificación alcalina de la clara formando geles más duros y con mayor resilencia que los formados con NaCl. Esto indica que debe ser evaluado el reemplazo de NaCl por KCl en la elaboración de huevos Pidan.

Palabras clave: gelificación alcalina, clara nativa, huevo Pidan, viscoelasticidad, textura.

ABSTRACT

Egg Pidan is made by dipping duck egg in 5% NaOH solution, 4% NaCl and 0.4% $CuSO_4$ at room temperature for 4-5 weeks. The objective was to analyze the effect of NaCl or KCl salts on the viscoelastic, textural and color characteristics of egg white gels formed by alkali. Frequency sweeps showed that alkaline gels of egg clear were strong gels (G '> G' ') with a degree of dependence G' with a frequency of approximately 0.16. The texture profile revealed, gels with KCl higher hardness (3.72 103 N) and resilience (71.2%) than gels with NaCl (1.74 103 N and 58.6%) and without salts (1.67 103 N and 50.4%). The gels were low adhesives and high cohesiveness. The color parameters (a and b) presented changes with the presence of the salts and did not differ the luminosity between gels with NaCl and without salts ($p> 0.05$). It is concluded that the KCl affected the alkaline gelation of the egg clear formed gels harder and resilient than those formed with NaCl. This indicates that the replacement of NaCl by KCl in the elaboration of Pidan eggs should be evaluated.

Keywords: Pidan egg, egg white alkali gelation, rheological behavior.

INTRODUCCIÓN

Los huevos se pueden conservar según el método tradicional chino. Éste consiste en sumergirlos en mezclas de arcilla, ceniza, sal, cal viva y cáscara de arroz durante varias semanas a varios meses. Se producen cambios químicos y físicos en la clara y yema del huevo, que le imparten un sabor nuevo característico y permite prologar su prolongada vida útil (Hou, 1981). El producto así conservado se denomina Pidan, o Huevo Centenario. El típico huevo Pidan se hace sumergiendo huevo de pato en una solución de 5% p/p de

NaOH, 4% p/p de NaCl y 0,4% p/p de $CuSO_4$ a temperatura ambiente por 4 - 5 semanas (Chen et al., 2015). La formación del huevo Pidan es causada por la penetración del álcali a través de la cáscara de huevo y la membrana, y conduce a cambios químicos en los componentes del huevo. Por lo general, albúmina y yema de huevo gradualmente se gelifican y endurecen (Blunt & Wang, 1918). La gelificación se define como la formación de una red continua, generalmente por entrecruzamiento no covalente (interacciones hidrofóbicas, uniones puente de hidrogeno y electrostáticas) e interacciones covalentes como las uniones disulfuro. Por las condiciones alcalinas, las moléculas de proteína se despliegan y reacomodan formando una matriz ordenada (Chen et al., 2015). Si bien hay muchos estudios realizado con la gelificación de clara de huevo utilizando ácidos o temperaturas, de nuestro conocimiento, no hay trabajos que evalúan la gelificación alcalina de la clara desde el punto de vista reológico. Una de las formas para detectar cambios en la formación de la red de un gel es la reología dinámica (Farías y Pilosof, 2016; Martinez et al., 2012). El objetivo fue analizar el efecto de las sales NaCl y KCl en las características viscoelásticas, texturales y de color de geles de clara de huevo formados por álcali.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se mezcló la clara de tres huevos de gallina (pH 9,0) con agitador magnético (WiseStir Modelo MSH-20D, Witeg, Alemania) durante 4 min a 300 rpm y temperatura ambiente. La chalaza fue removida.
Se prepararon las soluciones alcalinas según la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición porcentual (p/p) de las soluciones salinas.

soluciones	K^+	Na^+	NaOH
NaOH + KCl	5		4,2
NaOH + NaCl		5	4,2
NaOH			4,2

Caracterización de los geles por reología dinámica

Las mediciones se realizaron en un reómetro de esfuerzo de corte controlado Anton Paar Physica (MCR 301) (Graz, Austria) con temperatura controlada (25ºC) por un sistema Peltier. Se utilizó un sistema platos paralelos con una sonda PP25 dejando un gap de 1 mm. Se vertieron 400 □l de clara en el plato del reómetro e inmediatamente 90 □L de solución alcalina. Luego de 15 min, y una vez gelificado en el plato del reómetro se procedió con la medición.

Barridos de frecuencia

Las propiedades viscoelásticas del gel formado se midieron en función de la frecuencia de oscilación entre 0,004 y 2 Hz a 25ºC con una deformación del 5%, condición correspondiente a la región de viscoelasticidad lineal. Se registró el módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y la *tan* □.
El grado de dependencia de G' con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante n según la siguiente ecuación (Stading y Hermansson, 1990):

$$\log G' = n . \log f + K \quad (\mathbf{1})$$

donde, G' es el modulo elástico, f la frecuencia de oscilación y K una constante.

Formación de geles para los ensayos de color y textura

Los geles se formaron a temperatura ambiente con 8 mL de clara de huevo y 1,8 mL de las soluciones alcalinas usando la misma proporción de los ensayos de reología dinámica. Como la gelificación fue inmediata, por ello se agregó la solución alcalina bajo mezclado con espátula. Los geles se formaron en recipientes herméticos y cilíndricos de plástico de 2,5 cm de diámetro y 4 cm de altura y se almacenaron 24 hs a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos de color y textura.

Color de los geles

El escaneo se realizó tres veces en cada muestra (n = 4) a través de un colorímetro portátil MiniScan® EZ

(Hunter Lab, Reston, VA, USA). Se registraron los parámetros L: luminosidad (escala de 0 a 100), a: intensidad del color rojo (escala de -60 a 60) y b: intensidad de color amarillo (escala de -60 a 60).

Textura de los geles

El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó a 25ºC en un Texture Analyzer (model TA-XT2i; Stable Microsystems, Godalming, UK) usando una sonda cilíndrica de ebonita (P/05 1,27 cm de diámetro). Las muestras se comprimieron al 30% de la altura inicial con una velocidad de compresión de 0,5 mm s^{-1}. Los diferentes parámetros texturales (dureza, resilencia, cohesividad y adhesividad) se obtuvieron con el software (Texture Expert Exceed). Los ensayos se realizaron por cuadriplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prims v6.0 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA), utilizando el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

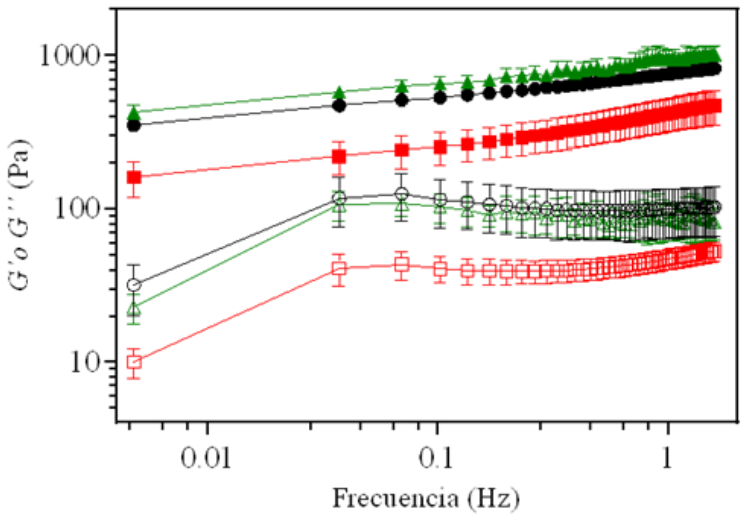


Figura 1. Barridos de frecuencia de los geles de clara de huevo formados por álcali. Clara + NaOH (▲△); Clara + NaOH + KCl (●○) y Clara + NaOH + NaCl (■□). Símbolos cerrados: *G'* y símbolos abiertos: *G''*.

La gelificación alcalina de la clara ocurrió inmediatamente, formando una red. A los 15 minutos de realizado el experimento, los geles se encontraron completamente formados (datos no mostrados). Los espectros mecánicos de los geles de clara de huevo se muestran en la **Figura 1**. La gelificación alcalina de la clara de huevo resultó en geles fuertes ($G' > G''$) en el rango de frecuencia estudiado. Los valores de *tan* □ (G''/G') oscilaron entre 0,08-0,20 para los geles alcalinos sin sales, entre 0,12 y 0,20 para los que contenían NaCl y entre 0,08-0,17 para aquellos con KCl. G' dependió de la frecuencia de oscilación con una pendiente, *n* (**Ecuación 1**) de aproximadamente 0,15, que no fue afectada por las sales (**Figura 2**)

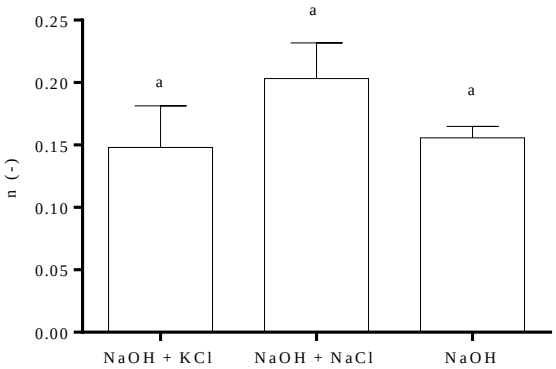


Figura 2. Grado de dependencia de *G´* con la frecuencia de los geles de clara de huevo formados por álcali. Las barras representan el desvío estándar (n = 2 o 3)

Los valores de *G´* a 1 Hz fueron 960 □ 200 Pa para aquellos sin sales, 420 □ 180 Pa para los geles de NaCl y 950 □ 140 Pa para aquellos con KCl.

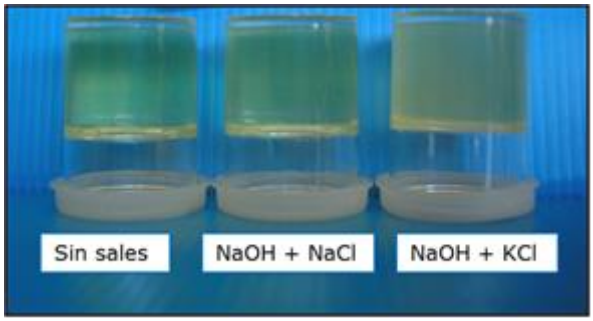


Figura 3. Geles de clara de huevo formados por álcali a 25ºC.

Los geles formados en recipientes plásticos transparentes en los cuales se midió el color y la textura se muestran en la **Figura 3**. A simple vista se observa una mayor turbidez en los geles formados en presencia de KCl. Las parámetros de color (L, a y b) de los geles se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros de color de los geles de clara de huevo. Media □ □desvío estándar (n = 4)

	L	a	b
NaOH	69,57 ± 0,99[a]	-8,29 ± 0,62[a]	43,37 ± 0,82[a]
NaOH + NaCl	67,43 ± 1,39[a]	-6,54 ± 0,64[b]	41,80 ± 0,45[b]
NaOH + KCl	63,70 ± 0,85[b]	-3,52 ± 0,32[c]	34,88 ± 0,31[c]

Los resultados no mostraron diferencia en la luminosidad (L) entre los geles con NaCl y sin sales ($p > 0,05$), y con respecto a los parámetros a y b, si hay diferencia entre los tres geles analizados ($p < 0,05$).

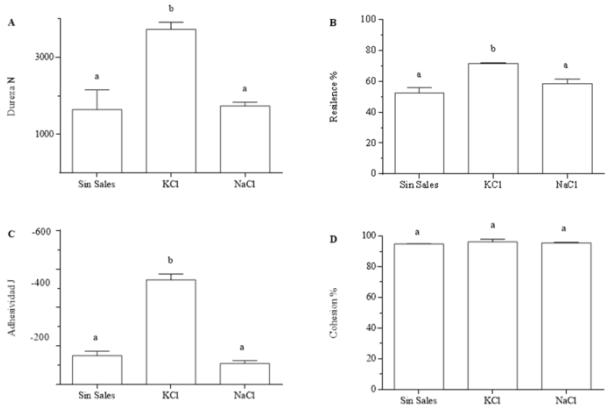


Figura 4. Parámetros de textura de geles de clara de huevo formados por álcali a 25ºC (n=4): A) Dureza; B) Resilencia; C) Adhesividad y D) Cohesión.

Los parámetros de perfil de textura en la **Figura 4** muestran que las durezas formadas en presencia de KCl son mayores, mientras que son similares para los geles sin sales o con NaCl, siendo los valores 3,72 10^3 N, 1,74 10^3 N y 1,67 10^3 N, respectivamente. El orden de la dureza no coincidió con lo mostrado anteriormente en los barridos de frecuencia. Según Chen et al., (2015), la dureza de los geles alcalinos de clara de huevo puede aumentar o disminuir con el tiempo, este efecto estaría relacionado con el entrecruzamiento de los puentes disulfuro de las moléculas proteicas que en presencia de KCl podría incrementarse con el tiempo (Ganasen y Benjakul, 2011).
Los geles con KCl presentaron mayor resilencia (71,2%) y adhesividad (-540 J) que los geles con NaCl (58,6%, -108 J) y sin sales (50,4%, -150 J). Los geles se caracterizaron por presentar alta cohesividad (cercana al 100%). La cohesividad alta, indicadora de la fortaleza de las uniones de los geles alcalinos de clara de huevo también fue observada por Chen et al (2015).
El modelo experimental propuesto para el tratamiento alcalino de la clara de huevo fue simple y permitió poder comparar las acciones de las sales desde el punto de vista reológico. Sin embargo, el proceso de formación y preservación del huevo entero es compleja. Para entender mejor este proceso son necesarios más estudios relacionados para comprender las distintas interacciones entre las proteínas.

CONCLUSIONES

El modelo experimental propuesto para el tratamiento alcalino de la clara de huevo fue simple y permitió poder comparar las acciones de las sales desde el punto de vista reológico. Sin embargo, el proceso de formación y preservación del huevo entero es compleja. Para entender mejor este proceso son necesarios más estudios relacionados las interacciones entre las proteínas. Se concluye que el KCl afectó la gelificación alcalina de la clara formándose geles más duros y residentes que los obtenidos con NaCl. Esto indica que debe ser evaluado el reemplazo de NaCl por KCl en la elaboración de huevos Pidan.

BIBLIOGRAFÍA

Blunt, K., and C.C. Wang. (1918) "Chinese Preserved Eggs- Pidan." Nat. Mod. J. China. 4:145.
Chen, Zhangyi, Li Jianke, Tu Yonggang, Zhao Yan, Luo Xuying, Wang Junjie et al. (2015). Changes in gel characteristics of egg white under strong alkali treatment. Food Hydrocolloids, 45, 1-8.
Farías, M. E. y Pilosof A. M. R. (2016). The influence of acid type on self-assembly, rheological and textural properties of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 55, 17-25.
Ganasen, P. y Benjakul S. (2011). Effects of green tea and chinese tea on the composition and physical properties of pidan white. Journal of Food Processing and Preservation, 35(6), 907-916.
Hou, H.C.(1981). Egg preservation in China**.** *Food and Nutrition Bulletin*,3(2), cap. 3
http://archive.unu.edu/unupress/food/8F032e/8F032E00.htm#Contents
Martinez, María J., Carrera Sánchez Cecilio, Rodríguez Patino Juan M. y Pilosof Ana M. R. (2012). Interactions between b-lactoglobulin and casein glycomacropeptide on foaming. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 89(0), 234-241.
Stading, Mats y Hermansson Anne-Marie. (1990). Viscoelastic behaviour of b-lactoglobulin gel structures. Food Hydrocolloids, 4(2), 121-135.

AGRADECIMIENTOS

Al Dpto. de Ciencias Básicas y Experimentales de la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, al Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, a la Agencia Nacional de Promoción

Científica y Tecnológica de la República Argentina (Proyecto PICT-2014-1402), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN).

Pigmentos antociánicos y actividad antioxidante de raíces de ahipa (*Pachyrhizus ahipa*)

Rolny N. [1], Zaro M. J. [2,3], Díaz A. [3], Dini C. [3], Viña S. Z. [2,3]

(1) Curso Análisis Químico, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) UNLP; [2] Curso Bioquímica y Fitoquímica FCAyF UNLP; [3] CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos), Facultad de Ciencias Exactas UNLP – CONICET La Plata – CIC-PBA. Calle 47 y 116 S/N°, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina. E-mail: nadiarolny@agro.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se caracterizaron y cuantificaron compuestos fenólicos presentes en los tejidos internos (córtex+cilindro vascular) y externos (rizodermis+tejidos anexos) de raíces de ahipa. Los extractos se obtuvieron con metanol:HCl 1% y se analizaron espectrofotométricamente (pico máximo de absorbancia: 520nm). Se cuantificaron antocianinas totales mediante el método del pH-diferencial. Los extractos se purificaron y analizaron mediante HPLC-DAD. Se determinó la actividad antioxidante (AA) por los métodos $ABTS^{\bullet+}$ y FRAP y se cuantificaron fenoles, flavonoides y taninos. La concentración de antocianinas en los tejidos externos superó 8,7 veces la de los internos. El análisis cromatográfico mostró un perfil similar en ambos sectores, observándose al menos 5 tipos de antocianinas diferentes. La AA de la rizodermis+tejidos anexos superó 20 y 24 veces a la del córtex+cilindro vascular ($ABTS^{\bullet+}$ y FRAP, respectivamente). Los tejidos externos presentaron concentraciones superiores de fenoles (2228,2±26,3mg ácido gálico/kg), flavonoides (2979,0±202,7mg catequina/kg) y taninos (3582,8±59,6mg ácido tánico/kg). En los tejidos internos, la concentración de dichos componentes fue 359±5,5mg ácido gálico/kg, 605,1+21,9mg catequina/kg y 313,8±20,5mg ácido tánico/kg, respectivamente. Así, las raíces de ahipa constituirían una fuente de compuestos bioactivos, con moderada actividad antioxidante en los tejidos internos. La elevada concentración de antocianinas en la rizodermis posibilitaría aprovechar este material de desecho para la obtención de pigmentos naturales.

Palabras Clave: cultivos no tradicionales; reutilización de residuos; compuestos fenólicos; componentes bioactivos

ABSTRACT

Phenolic compounds present in the internal (cortex+vascular cylinder) and external (rhizodermis+ annexes tissues) tissues of ahipa roots were characterized and quantified. The extracts were obtained with methanol: HCl 1% and analyzed spectrophotometrically (absorbance peak: 520nm). Total anthocyanins were quantified by the pH-differential method. The extracts were purified and analyzed by HPLC-DAD. Antioxidant activity (AA) was determined by the $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP methods. Total phenols, flavonoids and tannins were quantified spectrophotometrically. The concentration of anthocyanins in the outer tissues exceeded 8.7 times the internal one. Chromatographic analysis showed a similar profile in both sectors, showing at least 5 different types of anthocyanins. The AA of rhizodermis+annexes tissues exceeded 20 and 24 times the one of the cortex+vascular cylinder ($ABTS^{\bullet+}$ and FRAP, respectively). External tissues had higher concentrations of phenols (2228.2±26,3 mg gallic acid/kg), flavonoids (2979.0±202,7 mg catechin/kg) and tannins (3582.8±59.6 mg tannic acid/kg). In the internal tissues, the level of these components was 359±5.5 mg gallic acid / kg, 605.1+21.9 mg catechin/kg and 313.8±20.5 mg tannic acid/kg, respectively. Thus, the roots of ahipa constitute a source of bioactive compounds, with moderate antioxidant activity in the internal tissues. The high concentration of anthocyanins in the rhizodermis makes possible to take advantage of this waste material for the production of natural pigments.

Keywords: non-traditional crops; waste re-utilization; phenolic compounds; bioactive components

INTRODUCCIÓN

En la industria de los alimentos son comúnmente usados diversos colorantes sintéticos. El interés por los pigmentos naturales se ha incrementado marcadamente debido a que los consumidores están cada vez más preocupados por los potenciales efectos colaterales de los aditivos artificiales (Aguilera et al. 2016).

Las antocianinas extraídas de tejidos vegetales pueden ser sustitutos adecuados para los colorantes sintéticos debido a sus colores atractivos, brillantes, su solubilidad en agua y la ausencia de efectos adversos para la salud (Sang et al. 2017). Se trata de un grupo de metabolitos fenólicos ampliamente distribuidos en frutas y hortalizas, responsables de variados colores tales como rojo, azul, violeta, incluso ligeramente anaranjados. En los últimos años se ha investigado profusamente sobre las antocianinas, debido a que muestran un amplio rango de propiedades beneficiosas para la salud tales como actividad antioxidante, capacidad cardioprotectora, efecto anti-inflamatorio, y actividad anticarcinógena especialmente a nivel del colon, por las modificaciones que pueden provocar en la composición de la microbiota intestinal (Wang et al. 2017).

En la actualidad, varios estudios se han enfocado en el hallazgo de nuevas fuentes vegetales con alto contenido de antocianinas. Cultivos indígenas sub-utilizados, muchas veces poco explorados, frutas y hortalizas ricas en estos compuestos, atraen el interés sustancial de la industria alimentaria y farmacéutica, como alternativas naturales a los colorantes artificiales y por sus propiedades terapéuticas (Swer et al. 2016).

Las especies del género *Pachyrhizus* (familia Leguminosas), nativas de América Central y del Sur, producen raíces tuberosas que se caracterizan por la acumulación de almidón, junto con una relativamente alta cantidad de proteínas. Las principales especies cultivadas son: *P. tuberosus, P. erosus* y *P. ahipa*. Esta última especie, comúnmente conocida como ahipa o *Andean yam bean*, procede de los Andes bolivianos y el norte de Argentina (Doporto et al. 2010). La raíz se consume casi exclusivamente cruda, como las frutas, o incluso cocida. Su piel se desprende fácilmente (Milanez y Moraes-Dallaqua 2003) y acumula en algunos casos pigmentos antociánicos, que pueden también encontrarse presentes en la parte interior, carnosa, de la raíz.

El objetivo del presente trabajo fue extraer, caracterizar y cuantificar compuestos fenólicos presentes en los tejidos internos (córtex+cilindro vascular) y externos (rizodermis y tejidos anexos) de raíces de ahipa, a fin de evaluar su potencial como fuente de compuestos bioactivos antioxidantes y pigmentos naturales de uso alimentario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con raíces de *Pachyrhizus ahipa* cultivadas en la EEA Montecarlo del INTA (Misiones, Argentina). Las mismas se cosecharon en el mes de abril de 2016. Una vez recibidas en el laboratorio (CIDCA-La Plata), las raíces se lavaron, se desinfectaron por inmersión en una solución de NaOCl (200 ppm, 10 minutos) y se secaron a temperatura ambiente. Las raíces se pelaron, separando manualmente los tejidos externos (rizodermis y tejidos anexos) de los tejidos internos (córtex + cilindro vascular). Estos últimos se cortaron en rodajas. Todas las muestras fueron conservadas a -20ºC hasta su análisis.

Caracterización y cuantificación de antocianinas

La extracción de antocianinas, a partir de muestras congeladas en N_2 líquido y molidas en un molinillo hasta la obtención de polvos finos, exactamente pesadas, se llevó a cabo empleando metanol:HCl 1%. Los extractos se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu AA-6650, Japón), obteniéndose el pico máximo de absorbancia a 520 nm.

Posteriormente, el contenido de antocianinas totales se cuantificó mediante el método del pH-diferencial (Giusti y Wrolstad 2001). Dicho método se basa en la absorbancia diferencial de los compuestos a pH 4,5 y 1. En el primer caso (pH 4,5), se tomó una alícuota del extracto metanólico de los tejidos y se agregó buffer $NaCH_3COO$ 0,4M pH 4,5 (50:50); en el segundo caso (pH 1), a una alícuota del extracto se le agregó buffer KCl 0,025M pH 1 (50:50). Para el extracto obtenido a partir de los tejidos externos (rizodermis) la relación fue 20:80 para ambos pH. Se dejó reposar 15 min y se midió la absorbancia a 520 nm (longitud de máxima absorbancia) y a 700 nm. La cuantificación de antocianinas se realizó a partir de la siguiente expresión: A =

$(A_{máx} - A_{700nm})_{pH\ 1}$ - $(A_{máx} - A_{700nm})_{pH\ 4,5}$, donde $A_{máx}$ y A_{700nm} son los valores de absorbancia a 520 y 700 nm respectivamente, a cada uno de los valores de pH analizados: pH=1 y pH=4,5.

Para la caracterización de los pigmentos, los extractos metanólicos se concentraron en rotavapor y se reconstituyeron en agua. A continuación se purificaron mediante separación en fase sólida empleando una columna Strata C18-E (Phenomenex, Torrance, CA, USA) previamente equilibrada con dos volúmenes de agua y metanol. Las antocianinas retenidas en la columna se eluyeron finalmente con metanol:HCl. Los extractos purificados se filtraron en membrana de nylon (0,45 □m) y se analizaron mediante HPLC-DAD (Waters Model 6000A LC, Milford, MA., EE.UU.). Para ello se empleó una columna Symmetry C18 (Waters) de 150 x 3,9 mm y una fase móvil compuesta por 5% ácido fórmico (A) y metanol (B). El gradiente de elución fue: 0-2 min: 5% B; 2-10 min: 5-20% B; 10-15 min: 20% B; 15-30 min: 20-30% B; 30-35 min: 30% B; 35-45 min: 5%. El caudal de fase móvil se mantuvo en 0,5 mL/min, el volumen inyectado fue 10 µL y la detección se realizó a 520 nm (Wu et al. 2004).

Análisis de la actividad antioxidante (AA) y cuantificación de fenoles totales, taninos y flavonoides totales

Para la preparación de los extractos, las muestras congeladas en N_2 líquido fueron molidas en molinillo. Del polvo resultante se pesaron exactamente 1 g (rizodermis) y 4 g (tejidos internos) que fueron extraídos con 4 ml de acetona:agua 70% durante 30 min y en agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 12000×g (10 min a 4°C).

La determinación de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo según Singleton et al. (1999). A una alícuota de 350 µl de extracto se le agregaron 50 µl de una dilución 1:1 del reactivo Folin-Ciocalteu y 1000 µl de H_2O destilada. Luego de 3 min de reacción se añadió 100 µl de Na_2CO_3 20% (p/v) y se llevó a volumen final de 2,5 ml con H_2O destilada. Posteriormente la mezcla de reacción se incubó a 20°C en oscuridad durante 90 min. Se midió la absorbancia a 760 nm y el contenido de compuestos fenólicos totales se cuantificó empleando ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg /kg.

La determinación de taninos totales se realizó de acuerdo a Makkar et al. (2007). Una alícuota de 1000 µl de los extractos se hizo reaccionar con 1000 µl H_2O destilada y 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Se agitó e incubó a 4°C durante 15 min y posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Los extractos pre-tratados se hicieron reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu tal como se describió anteriormente para la cuantificación de fenoles totales, a fin de obtener la fracción correspondiente a Fenoles No Taninos. El contenido de taninos se determinó por diferencia (Taninos = Fenoles Totales – Fenoles No Taninos) empleando ácido tánico como estándar. Los resultados se expresaron en mg/kg.

El contenido de flavonoides totales se determinó según Shin et al. (2007). A una alícuota de 800 µl de extracto se le añadió 200 µl H_2O destilada y 75 µl $NaNO_2$ al 5% (p/v). Se agitó e incubó 5 min a 25°C. Luego se agregó 75 µl $AlCl_3$ al 10 % (p/v), se agitó e incubó 6 min a 25°C. Finalmente se agregó 500 µl de NaOH 1M y se llevó a volumen final de 2500 µl con H_2O destilada. La absorbancia de la solución fue medida luego de 30 min a 510 nm. El contenido de flavonoides totales se calculó empleando catequina como estándar. Los resultados se expresaron en mg/kg.

La determinación de la actividad antioxidante se llevó a cabo a partir de la inactivación del radical $ABTS^{\bullet+}$ (Re et al. 1999). Para ello se colocaron 10 µl del extracto acetónico y se añadió 1 ml de solución $ABTS^{\bullet+}$ (absorbancia 0,700±0,02 a 734 nm). Se incubó durante 6 min a temperatura ambiente y la caída de la absorbancia se midió espectrofotométricamente a 734 nm. Se empleó Trolox como antioxidante estándar y los resultados se expresaron como Actividad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) en mg/kg.

Se midió asimismo la actividad antioxidante por el método FRAP basado en la capacidad de una muestra de reducir el catión Fe^{3+}, según Benzie y Strain (1996). A 100 □l de extracto se le añadieron 900 µl de una solución buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,6) en presencia de tripiridil triazina férrica (TPTZ) y $FeCl_3$. La mezcla de reacción se incubó durante 7 min y se determinó la absorbancia a 593 nm. Se empleó Trolox como antioxidante estándar y los resultados se expresaron en mg/kg.

Análisis estadístico

En todos los casos, las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado. Los datos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) correspondiente con un nivel de significación $p<0,05$. Las medias se compararon con el test de la diferencia mínima significativa (DMS) ($p<0,05$).
Para el análisis se utilizó el programa Infostat versión 2012 (Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de antocianinas en los tejidos externos superó 8,7 veces la cuantificada en los tejidos internos (1630,7±49,7 y 186,9±1,2 mg/kg, respectivamente). En la **Figura 1** puede apreciarse la mayor pigmentación en la zona exterior respecto a la interior de las raíces, principalmente en la cara interna de lo que comúnmente se denomina "cáscara".
El análisis cromatográfico de los extractos purificados mostró un perfil similar en ambas zonas del tejido, observándose cinco picos bien resueltos, por lo que las raíces de ahipa contienen una mezcla de al menos 5 tipos de antocianinas diferentes (**Figura 2**). Por lo común, ciertos órganos y tejidos vegetales contienen mezclas más o menos complejas de diferentes pigmentos, y este tipo de distribución se verifica también para las antocianinas.
Por ejemplo, y como ha sido reportado previamente, las antocianinas de los frutos de berenjena (*Solanum melongena* L.) presentan un perfil cromatográfico compuesto por cuatro picos bien diferenciados correspondientes a las cuatro delfinidinas presentes, correspondiendo el pico más retenido al compuesto mayoritario: delfinidin 3-rutinósido (Zaro et al. 2014). En la **figura 2** se observa que en ahipa existen cuatro antocianinas prevalentes (correspondientes a los picos designados como A, B, C y E), cuyos tiempos de retención fueron de 19,80; 25,45; 28,53 y 33,95 min, respectivamente. Estos valores se encuentran comprendidos en el rango de t_R que abarcan las antocianinas de berenjena (16,75 – 36,61 min), bajo las mismas condiciones de corrida.

Figura 1. A) Raíces enteras, con su rizodermis ("cáscara") (izquierda) y peladas (derecha); B) rizodermis y tejidos anexos ("cáscara") (cara externa a la izquierda e interna a la derecha; C) Corte transversal de las raíces peladas (córtex+cilindro vascular).

Wu y Prior (2005), quienes han estudiado el perfil de antocianinas provenientes de diferentes fuentes, observaron que las delfinidinas de berenjena aparecen a valores de t_R entre 13,5 y 24,7 min en las condiciones de corrida empleadas. En dicho trabajo, de todas las fuentes vegetales estudiadas, sólo las delfinidinas, junto con la petunidina 3,5-diglucósido, son las antocianinas que aparecen a t_R inferiores a 24,6 min. Bajo las mismas condiciones, en el presente trabajo se observó que las principales antocianinas de ahipa aparecen a valores de t_R menores que el correspondiente al pico más retenido de berenjena.

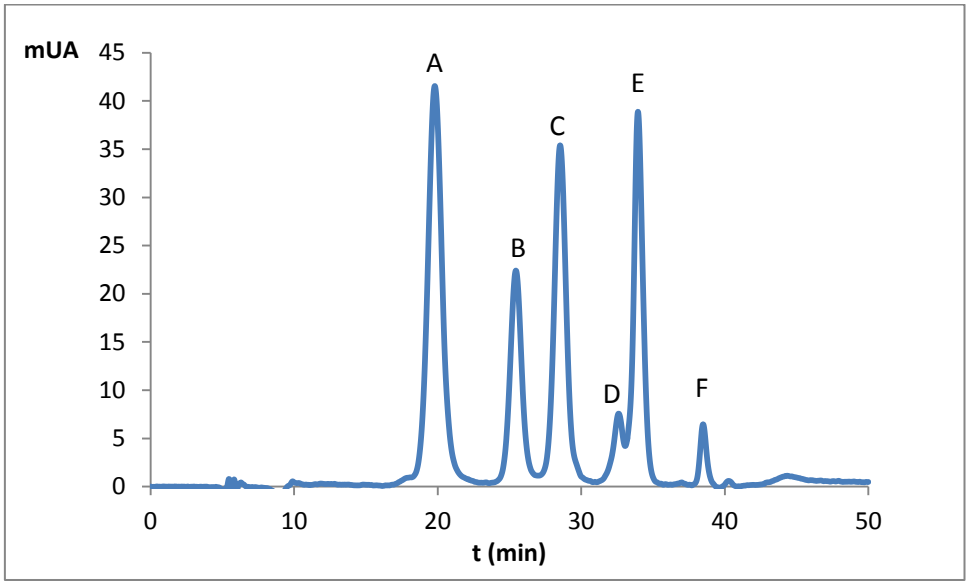


Figura 2. Cromatograma obtenido para las antocianinas de ahipa. Las letras A-F identifican los diferentes picos observados en la corrida.

Con respecto a antocianinas presentes en raíces, Kammerer et al. (2004) informaron que el contenido de antocianinas totales en los extractos obtenidos a partir de 15 cultivares de zanahoria negra (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) se encontró en el rango de 45,4 mg/kg a 17,4 g/kg de materia seca.

Por otra parte, Terahara et al. (1999) han señalado que ocho antocianinas aciladas fueron aisladas a partir de las raíces tuberosas de batatas púrpuras o violetas (*Ipomoea batatas* cultivar Yamagawamurasaki), que constituyen una fuente de colorantes alimentarios. Seis de estos compuestos fueron identificados como antocianinas diaciladas, en las que cada sustituyente acilo fue un residuo *p*-hidroxibenzoilo, *(E)* cafeilo o *(E)* ferulilo, determinado principalmente mediante análisis NMR.

Se encuentra descripto que los residuos de azúcar de las antocianinas pueden estar acilados con ácidos orgánicos. Los agentes acilantes comunes incluyen a los ácidos cinámicos, tales como cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico (Bąkowska-Barczak 2005). Aparecen también ciertos ácidos alifáticos tales como el acético, málico, malónico, oxálico y succínico. Los ácidos cinámicos pueden ellos mismos portar azúcares glicosídicos. La acilación aromática y alifática puede ocurrir en una misma molécula, formando una estructura poliacilada.

De acuerdo con Bąkowska-Barczak (2005), el hallazgo de que los pigmentos antociánicos que contienen sustituyentes acilos son marcadamente estables abre nuevas oportunidades para los procesadores de alimentos. Las antocianinas aciladas están presentes en grandes cantidades en hortalizas tales como repollo colorado, zanahoria negra, rábano rojo, papas rojas, maíz rojo, entre otros. Estos pigmentos presentan una baja sensibilidad a los cambios de pH y una mayor estabilidad al calor y la luz. Por esta razón, las antocianinas aciladas resultarían adecuadas para incorporarse en la formulación de alimentos con bajo pH, como también en productos neutros y ligeramente alcalinos (como por ejemplo productos lácteos, polvos y postres listos para consumir).

Las determinaciones llevadas a cabo para este trabajo se complementarán con análisis orientados a la caracterización estructural detallada de los compuestos presentes, a través de espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) y análisis mediante HPLC-MS.

En cuanto a la cuantificación espectrofotométrica de los compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos,

los resultados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Contenido de fenoles, flavonoides totales y taninos en raíces de ahipa

Parte de la raíz analizada	Fenoles totales (mg de ácido gálico/kg)	Flavonoides totales (mg de catequina/kg)	Taninos (mg de ácido tánico/kg)
Rizodermis y tejidos anexos (“cáscara”)	2228,2±26,3 [a]	2979,0±202,7 [a]	3582,8±59,6 [a]
Córtex y cilindro vascular	359±5,5 [b]	605,1+21,9 [b]	313,8±20,5 [b]

Los valores informados corresponden a las medias ± la desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

La evaluación del contenido de compuestos fenólicos resulta sumamente relevante, ya que se ha mencionado que contribuyen directamente a la acción antioxidante de los productos de origen vegetal (Duh et al. 1999). Huang et al. (2004) han indicado que los compuestos polifenólicos tienen efectos inhibidores sobre la mutagénesis y carcinogénesis en los seres humanos, cuando se lleva a cabo una ingesta de hasta 1,0 g todos los días a partir de una dieta rica en frutas y hortalizas (Tanaka et al. 1998). Las actividades antioxidantes observadas se pueden atribuir a los diferentes mecanismos ejercidos por los diversos compuestos fenólicos y a los efectos sinérgicos desarrollados.
Según Huang et al. (2004) los compuestos flavonoides totales de diferentes fracciones extraídas a partir de plantas de batata, expresados como µmoles equivalentes de catequina por gramo de peso seco, se presentaron en mayor concentración en los extractos acuosos obtenidos de las hojas. Los extractos obtenidos en ese caso a partir de los órganos subterráneos presentaron una concentración de flavonoides totales 14 veces más baja.
Las plantas de ahipa se caracterizan por presentar en la parte aérea compuestos fenólicos del tipo de los isoflavonoides, específicamente rotenona, que le confieren toxicidad a los tejidos (Catteau et al. 2013). En cuanto a sus mecanismos de acción, la toxicidad aguda de la rotenona en insectos está relacionada con su capacidad para bloquear el complejo óxido-reductasa NADH-ubiquinona y para inhibir las cadenas respiratorias mitocondriales. En los mamíferos se ha comprobado que la rotenona causa daño oxidativo a nivel celular y pérdida neuronal dopaminérgica implicada en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (Lautié et al. 2012). Por este motivo, y con los materiales genéticos disponibles, resulta limitado el aprovechamiento de los órganos superiores de las plantas de ahipa, mientras que sus raíces constituyen la única parte comestible.
Los valores hallados en la cuantificación de la actividad antioxidante (AA) de los distintos componentes de las raíces, se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Actividad antioxidante (AA) de raíces de ahipa

Parte de la raíz analizada	AA (mg Trolox equivalentes /kg)	
	$ABTS^{\bullet+}$	FRAP
Rizodermis y tejidos anexos (“cáscara”)	6.278,0±175,6 [a]	10.856,3±425,7 [a]
Córtex y cilindro vascular	309,3±40,1 [b]	439,2±13,5 [b]

Los valores informados corresponden a las medias ± la desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

De los valores indicados en la **Tabla 2**, puede observarse que la AA de la rizodermis y tejidos anexos superó en 20 y 24 veces a la del córtex+cilindro vascular, según los ensayos $ABTS^{\bullet+}$ y FRAP, respectivamente.
Para la extracción a partir de los tejidos vegetales de compuestos antioxidantes de carácter hidrofílico se han utilizado distintos solventes, tales como metanol, etanol, mezclas de etanol-agua, acetona-agua y metanol-agua, así como también extracciones en medio ácido (pH=2) con metanol-agua, seguida de acetona-agua y agua-acetonitrilo, ensayados en diferentes relaciones (Agudo Medina 2010).

Los métodos seleccionados para la cuantificación del efecto antioxidante corresponden, en el caso del empleo del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, a una determinación directa donde se mide la disminución de la absorbancia por una reducción en la concentración del radical, a medida que se produce su inactivación. Por otra parte, el método FRAP representa una determinación indirecta, que se fundamenta en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+}, reduciéndose el complejo férrico-TPTZ incoloro, para obtener el complejo ferroso coloreado.
Sreeramulu y Raghunath (2010) determinaron la actividad antioxidante de raíces, tubérculos y hortalizas comúnmente consumidos en India y la correlacionaron con el contenido de compuestos fenólicos totales. Dichos autores informaron que la actividad FRAP de las muestras analizadas se encontró en el rango de 243 a 10.510 mg equivalentes de $FeSO_4$/100 g. La actividad más alta correspondió a repollo colorado, que también contiene antocianinas en sus tejidos, y la más baja, a calabaza. En general, observaron una buena correlación entre los contenidos de fenoles totales y la actividad antioxidante, medida en ese caso por los métodos $DPPH^{\bullet}$ y FRAP para las hortalizas, raíces y tubérculos estudiados.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, los compuestos fenólicos del tipo flavonoides, y especialmente las antocianinas, son mayoritarios en raíces de ahipa y responsables en gran medida de su capacidad antioxidante. En este sentido, además de ser aprovechadas por su contenido de almidón (principal compuesto de reserva), las raíces de ahipa resultan una buena fuente de compuestos potencialmente bioactivos, con moderada actividad antioxidante en los tejidos internos. Por su parte, la elevada concentración de antocianinas en la rizodermis resulta interesante desde un punto de vista agroindustrial, puesto que constituye un material de desecho que podría ser aprovechado para la obtención de aditivos alimentarios y pigmentos naturales.

BIBLIOGRAFÍA

Agudo Medina L. 2010. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. Autodidacta, Revista de la Educación en Extremadura, 27-34.
Aguilera Y, Mojica L, Rebollo-Hernanz M, Berhow M, González de Mejía E, Martín-Cabrejas MA. 2016. Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by β-cyclodextrin copigmentation in a sport beverage. Food Chemistry, 212: 561–570.
Bąkowska-Barczak A. 2005. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a Review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 14/55: 107–116.
Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1):70-76.
Catteau L, Lautie E Kone O, Coppee M, Hell K, Pomalegni CB, Quetin-Leclercq J. 2013. Degradation of rotenone in yam bean seeds (*Pachyrhizus* sp.) through food processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 11173−11179.
Doporto MC, Mugridge A, Chaves AR, García MA, Viña SZ. 2010. Valor nutritivo y parámetros fisiológicos relativos a la conservación poscosecha de raíces de ahipa (*Pachyrhizus ahipa*). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 11: 75-81.
Duh PD, Tu YY, Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chyrsanthemum morifolium* Ramat). Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie, 32: 269-277.
Giusti M, Wrolstad RE. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. En: Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P, editores. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc. pág F.1.2.1-F.1.2.13.
Huang D-J, Lin Ch-D, Chen H-J, Lin Y-H. 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato

(*Ipomoea batatas* [L.] Lam `Tainong 57') constituents. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 179-186.
Kammerer D, Carle R, Schieber A. 2004. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. European Food Research and Technology, 219: 479-486.
Lautié E, Rozet E, Hubert P, Quetin Leclercq J. 2012. Quantification of rotenone in seeds of different species of yam bean (*Pachyrhizus* sp.) by a SPE HPLC–UV method. Food Chemistry, 131:1531–1538.
Makkar HPS, Siddhuraju S, Becker K. 2007. Plant secondary metabolites. Totowa, NJ, Humana Press Inc. pág 122.
Milanez CRD, Moraes-Dallaqua MA. 2003. Ontogênese do sistema subterrâneo de *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi (*Fabaceae*). Revista Brasileira de Botanica, 26: 415-427.
Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9–10): 1231–1237.
Sang J, Sang J, Ma Q, Hou X, Li C. 2017. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. Food Chemistry, 218: 386–395.
Shin Y, Liu R, Nock J, Holliday D, Watkins C. 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45(3): 349–357.
Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299: 152-178.
Sreeramulu D, Raghunath M. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India. Food Research International, 43: 1017–1020.
Swer TL, Chauhan K, Paul PK, Mukhim C. 2016. Evaluation of enzyme treatment conditions on extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. International Journal of Biological Macromolecules, 92: 867–871.
Tanaka M, Kuei CW, Nagashima Y, Taguchi T. 1998. Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. Nippon Suisan Gakkaishil., 54: 1409-1414.
Terahara N, Shimizu T, Kato Y, Nakamura M, Maitani T, Yamaguchi M, Goda Y. 1999. Six diacylated anthocyanins from the storage roots of purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 63: 1420-1424.
Wang Y, Li J, Li B. 2017. Chitin microspheres: A fascinating material with high loading capacity of anthocyanins for colon specific delivery. Food Hydrocolloids, 63: 293-300.
Wu X, Prior RL. 2005. Identification and characterization of anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 3101-3113.
Zaro MJ, Keunchkarian S, Chaves AR, Vicente AR, Concellón A. 2014. Changes in bioactive compounds and response to postharvest storage conditions in purple eggplants as affected by fruit developmental stage. Postharvest Biology and Technology, 96: 110-117.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a los Ingenieros Fassola H., Rohatsch P. y Feltan R. (EEA-INTA Montecarlo) por la provisión de las raíces de ahipa. El financiamiento para la realización de este trabajo fue otorgado por la ANPCyT (PICT 2012-1213, IR Dra. MA García) y el CONICET (PIP 0555, Titular Dra. SZ Viña).

Mieles de abejas nativas del departamento Pirané, provincia de Formosa, Argentina

Romero C.A.[1,3], Montenegro S.B.[1], Baldi Coronel B.M.[2]

(1) Universidad Nacional del Chaco Austral, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.
(2) Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.
(3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
ceciliaromero@uncaus.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar y analizar las propiedades fisicoquímicas de las mieles de abejas nativas de las localidades El Colorado y La Sirenita, Formosa, Argentina. Las mieles analizadas presentaron un contenido de humedad y actividad acuosa que osciló de 21,6 a 25,2% y de 0,68 a 0,72 respectivamente. Los valores de acidez libre (42,08 ± 15,68 meq/kg), lactónica (3,91 ± 2,86 meq/kg) y total (45,35 ± 14,16 meq/kg), fueron similares a los reportados por otros autores para mieles de meliponinos. El pH presentó un valor promedio de 4,21 ± 0,54. Tanto la conductividad como el contenido de cenizas, oscilaron en un amplio rango de valores, de 305,0 a 1424,0 µS/cm y de 0,05 a 0,63 g/100 g, respectivamente, asimismo el coeficiente de correlación entre dichos parámetros fue de 0,98. El color de las mieles varió desde ámbar extra claro a oscuro. Se concluye que las muestras analizadas presentaron valores fisicoquímicos que se encuentran dentro de los estándares propuestos para mieles de meliponinos latinoamericanos. Muestras más oscuras, tienen valores más altos en contenido de cenizas, conductividad y acidez, que mieles claras. El origen geográfico solo ejerció influencia en el parámetro pH.

Palabras clave: abejas sin aguijón, propiedades fisicoquímicas, caracterización.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the physicochemical properties of native honey bees in the towns El Colorado and La Sirenita, Formosa, Argentina, and to analyze if there are differences according to the geographic origin. The analyzed honey had a moisture content and water activity that ranged from 21.6 to 25.2% and 0.68 to 0.72 respectively. Free acidity values (42.08 ± 15.68 meq/kg), lactone (3.91 ± 2.86 meq/kg) and total (45.35 ± 14.16 meq/kg) were similar to those reported by other authors for honey from stingless bees. The pH showed a mean value of 4.21 ± 0.54. Both conductivity and ash content, oscillated in a range of values of 305.0 to 1424.0 mS/cm and 0.05 to 0.63 g/100 g, respectively the correlation coefficient between these parameters was 0.98. The colour of honey varied from extra-light amber to dark amber. It has been concluded, that the samples that were analysed showed physicochemical values in relation to the honey produced by stingless bees from Latin American. It has been proven that the darker samples have higher values in ash content, acidity, and that clear honey. The geographical origin only influenced the pH parameter.

Keywords: stingless bees, physicochemical properties, characterization.

INTRODUCCIÓN

Las abejas nativas o sin aguijón son un grupo de insectos sociales que pertenecen a la familia Apidae, subfamilia Meliponinae (Vit et al. 2004). Las abejas sin aguijón, se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Alrededor de 500 especies han sido descritas (Michener 2007). En Brasil, Paraguay y parte de Argentina existen más de 300 especies de abejas sin aguijón (CEDIT 2005) que están distribuidas en tres ecorregiones: la Selvas Paranaenses, el Chaco (Húmedo y Seco) y las Selvas

Subtropicales de Montañas o Yungas (Baquero y Stamatti 2007). Estas abejas nidifican tanto en cavidades que encuentran disponibles (agujeros en árboles o muros, nidos abandonados o vivos o de otros insectos), como en sitios expuestos.

La miel de melipónidos se extrae en pequeñas cantidades (aproximadamente 1-2 kg/colmena/año). La manera tradicional de obtener los productos de nidos naturales comprendía la localización, acceso a la cavidad donde se hallaba el nido y cosecha de la miel por prensado de los potes de cerumen. En ocasiones se consumía también el polen y la cría (amago) y se utilizaba el cerumen. En Formosa, la población local tiene uno de los índices de pobreza más altos en el país, y en algunas temporadas, a pesar de la tradición de conservar las colonias, se destruyen algunos nidos para consumo (Basilio et al. 2013).

La meliponicultura se refiere a la cría y manejo de abejas sin aguijón y recibe este nombre debido a que este tipo de abejas se clasifica taxonómicamente dentro de la tribu Meliponini (Hymenoptera, Apoidea), que corresponde a uno de los muchos grupos de abejas sin aguijón (Rosso Londoño y Nates-Parra 2005). Esta actividad es muy importante porque estas abejas desempeñan un papel sustancial en la polinización de diversas plantas y en especial de las plantas nativas. Las abejas nativas transportan más polen por individuo, lo que las hace más eficientes que la *Apis mellifera* (abeja extranjera) porque transportan más polen por individuo. (CEDIT 2005, Diodato et al. 2008, Spagarino et al. 2014). Las abejas silvestres, además del papel fundamental que desempeñan como agentes polinizadores, son productoras de miel con propiedades terapéuticas, que cotizan en mercados internacionales (Baquero y Stamatti 2007, Diodato et al. 2008). Los usos medicinales de estas mieles incluyen: tratamientos de erupciones de la piel, problemas respiratorios, trastornos urinarios, llagas, como ungüentos, paspaduras, infecciones cutáneas, entre otros. Diluida con agua se la usa en aplicaciones oftálmicas (Vit et al. 2004).

En países, como México, Brasil, Costa Rica y El Salvador, la crianza de estas abejas se está tornando una práctica común. En Argentina los trabajos en meliponicultura se encuentran aún en una etapa inicial, a pesar de que existen numerosas especies de abejas con excelentes cualidades para esta producción (Baquero y Stamatti 2007, Diodato et al.,2008). La práctica de cría racional de abejas nativas y la concientización de la importancia de estas especies, contrarrestaría parcialmente el riesgo que actualmente corren debido a la deforestación, el monocultivo en grandes extensiones y la ganadería que disminuyen el número de colonias de abejas silvestres y su hábitat natural.

La composición química de la miel es dependiente de la flora utilizada por las abejas, de las condiciones regionales y climáticas y el estado de la colonia, por lo que las propiedades varían según la zona de procedencia. La miel producida por estas abejas, es un excelente alimento dada su composición y además, cumple con características bioactivas, ya que son ricas en compuestos polifenólicos, considerándolas como un producto alimenticio natural con actividades antioxidantes y proteicas (Cauich Kumul et al. 2015).

Según White (1978), ciertas levaduras osmofílicas, cuando están presentes en la miel, se multiplican a medida que aumenta la humedad, lo que facilita el proceso de fermentación. Estos microorganismos están presentes en el cuerpo de las abejas, en el néctar, en el suelo, y en la extracción de la miel, lo cual es importante teniendo en cuenta el elevado contenido de humedad de las mieles de abejas nativas. Por otro lado, Echigo y Takenaka (1974) afirman que la disminución del pH y el aumento de la acidez, en el proceso de formación de miel, son causados principalmente por ácidos orgánicos producidos por enzimas, especialmente por el ácido glucónico. Estos ácidos orgánicos se pueden formar, a partir de la fructosa, la glucosa y la sacarosa presentes en el néctar, por la acción de diversas enzimas secretadas por las abejas. La acidez afecta tanto el sabor como el aroma de la miel, esto se debe a la presencia de ácidos orgánicos, en particular glucónico, pirúvico, málico y cítrico, en equilibrio con lactonas o ésteres e iones inorgánicos (Isla et al. 2011).

Actualmente no existen estándares de calidad para las mieles de abejas sin aguijón ya que las normativas vigentes se basan en el producto de la abeja *Apis mellifera* y existen importantes diferencias entre dichas mieles. Las características más destacadas son el mayor contenido en humedad y de acidez respecto de la miel comúnmente comercializada (Vit et al. 2004).

Por lo que se propone, analizar las propiedades fisicoquímicas de las mieles de abejas nativas de dos

localidades del departamento Pirané, provincia de Formosa, a fin de caracterizarlas y determinar la correlación de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron seis muestras de mieles de abejas nativas de dos localidades: El Colorado y La Sirenita. Las vasijas contenedoras de miel fueron tomadas de cajones racionales durante los meses de enero y noviembre del año 2015. La extracción de miel se realizó por succión con jeringas descartables, luego dichas muestras fueron almacenadas en recipientes plásticos estériles de tamaño adecuado a -20°C hasta el momento de su análisis.

La humedad se analizó por medio de un refractómetro de Abbe (AOAC. 969.38 1990). El contenido de cenizas se determinó en mufla a 600°C hasta peso constante, previa calcinación de la muestra (AOAC 920.181 1990). La acidez libre, lactónica y total se determinó por método volumétrico (AOAC 962.19, 1990) y se expresó en meq/kg de miel. El pH se midió con un pHmetro OAKTON modelo CON 510, siguiendo la técnica especificada por AOAC 962.19 (1990). La conductividad se determinó en µS/cm mediante un conductivímetro marca OAKTON modelo CON 510. La actividad acuosa y el color (en mm Pfund) se midieron por lectura directa en el equipo testo 650 y en el Honey color photometer HANNA Modelo HI 96785985.25, respectivamente.

El análisis estadístico se realizó con los valores hallados por duplicado de cada muestra analizada, utilizando el programa Infostat. Además de las medidas de resumen se realizó un análisis de correlación de parámetros tomando el coeficiente de correlación: Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores hallados en mieles de abejas sin aguijón del departamento Pirané, provincia de Formosa, se exponen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de mieles de abejas sin aguijón del departamento Pirané, Formosa.

Parámetros		Media ± DE	Mínimo	Máximo
Humedad (%)		23,62 ± 1,20	21,60	25,20
pH		4,21 ± 0,54	3,42	4,91
	Libre	42,08 ± 15,68	28,64	74,57
Acidez (meq/kg)	**Lactónica**	3,91 ± 2,86	0,17	7,61
	Total	45,35±14,16	35,53	74,62
Conductividad (µS / cm)		952,58 ± 391,45	305,00	1424,00
Cenizas (g / 100 g)		0,39 ± 0,23	0,05	0,63
Color (mm Pfund)		85,08 ± 42,39	35,00	150,00
Actividad acuosa		0,70 ± 0,01	0,68	0,72

El contenido de humedad depende de varios factores, como la temporada de cosecha, el grado de madurez de la miel y los factores climáticos (Finola et al. 2007). La miel de abejas sin aguijón se caracteriza por contener mayor humedad que la miel de *Apis mellifera* (Chuttong et al. 2016). En las muestras analizadas este parámetro osciló entre 21,6 y 25,2%, valores que se mantuvieron por debajo del máximo de 30%, correspondiente a los estándares sugeridos por Vit et al. (2004) para mieles de abejas sin aguijón. Valores similares (22,20 - 27,40%) fueron publicados en mieles de abejas nativas de la provincia de Misiones (Vit et al. 2009) y en la provincia de Formosa se hallaron muestras con contenidos de humedad entre 17,8 y 24,0%

(Basilio et al. 2013).
El pH presentó un valor promedio de 4,21 ± 0,54, similar a lo publicado por Sgariglia et al. (2010), para mieles de abejas nativas de Tucumán (4,25 ± 0,5) pero más alto que la media de 3,72 ± 0,02, hallada en muestras de mieles de *Tetragonisca angustula* de la provincia de Misiones (Pucciarelli et al. 2014). Este parámetro es de gran importancia durante la extracción y almacenamiento de miel porque influye en su textura, la estabilidad y la vida útil (Gomes et al. 2011).
Vit et al. (2004) menciona que la acidez de la miel de abejas sin aguijón es muy alta en comparación con la miel de *Apis mellifera*, y sugiere que las normas específicas para estas abejas nativas, deben tener en cuenta valores máximos de acidez entre 70 y 85 meq/100 g miel. La acidez libre encontrada en las muestras analizadas varió entre 28,64 y 74,57 meq/kg de miel, valores que se mantuvieron dentro del rango publicado en mieles de la provincia de Misiones (de 25 a 160 meq/kg) (Pucciarelli et al. 2014). A su vez, el promedio hallado (42,08 ± 15,68 meq/kg) fue similar a promedio de 43,7 ± 9,8 meq/kg pero inferior al de 62 ± 2,8 meq/kg, informados por Basilio et al. (2013) para mieles de *Scaptotrigona jujuyensis* de la provincia de Formosa, correspondientes a las localidades de Laguna Blanca y Las Lomitas, respectivamente.
La acidez lactónica hallada en las muestras (3,91 ± 2,86 meq/kg) fue inferior a lo publicado para mieles de abejas sin aguijón de Australia (4.7 ± 0.8 meq / kg) (Oddo et al. 2008).
La acidez total se obtiene por la suma de la acidez libre y lactónica (AOAC, 1990), las muestra analizadas presentaron una acidez total media de 45,35 ± 14,16 meq/kg, valor que se mantuvo dentro del rango hallado (17,88 – 86,85 meq/kg) en mieles de abejas sin aguijón del noreste de Brasil (Sousa et al. 2016). Las mieles analizadas que presentaron una acidez más elevada fueron aquellas con una coloración más alta, esta relación se explicó estadísticamente mediante un coeficiente de correlación de 0,76 ($p < 0,0041$). La actividad acuosa presentó valores con una media de 0,70 ± 0,01, similares a los hallados en mieles de *Tetragonisca angustula* del municipio de Piracicaba, Estado de São Paulo, que registraron valores entre 0,59 - 0,82, con un promedio 0,66 aw. La actividad acuosa es una medida de reciente enfoque en la miel (Anacleto et al. 2009).
Tanto la conductividad como el contenido de cenizas, oscilaron en un amplio rango de valores, de 305,0 a 1424,0 µS/cm y de 0,05 a 0,63 g/100 g, respectivamente, asimismo el coeficiente de correlación entre dichos parámetros fue de 0,98 ($p < 0,0001$). Solo dos muestras superaron levemente el máximo de 0,5 g/100g de miel que propone Vit et al. (2004) para el contenido de cenizas en mieles de abejas sin aguijón. Basilio et al. (2013) publicó que las muestras de mieles de *Tetragonisca angustula* de Laguna Blanca presentaron valores de conductividad entre los más altos reportados para la región, concordantes con el color más oscuro de las muestras.
El color de las mieles analizadas varió entre ámbar extra claro a ámbar oscuro. Vit et al. (2009) reportó valores entre 74,00 y 131,00 mm Pfund para mieles de *Tetragonisca angustula* de Misiones y Basilio et al. (2013) en mieles de *Scaptotrigona jujuyensis* de Formosa halló valores entre 72 y 135 mm Pfund. Además, al igual que lo reportado por Sgariglia et al. (2010), se encontró que existe una relación significativa entre el contenido de cenizas y el color, hallándose un coeficiente de Pearson de 0,75 ($p = 0,03$). Confirmando de esta manera lo publicado por White (1975), quien menciona que el color ámbar oscuro de las mieles es atribuida a un contenido mineral más alto.
Por último, al analizar la influencia del origen geográfico a través del análisis de varianza con el método de comparación de Tukey, se observaron diferencias significativas sólo para el parámetro pH, registrando valores inferiores en la localidad de El Colorado con un valor promedio de 4,04 ± 0,46. El resto de las variables no se vieron influenciadas por el origen geográfico. Este análisis es interesante a fin de observar cómo variaron los diferentes parámetros según la localidad pero vale aclarar que para asegurar si el origen geográfico puede influir o no en las características de la miel sería necesario contar con cosechas de diferentes años.

CONCLUSIONES
Se concluye que las muestras analizadas presentaron valores que se encuentran dentro de los estándares

propuestos para mieles de abejas nativas de Guatemala, México y Venezuela y que las muestras más oscuras, tienen valores más altos en contenido de cenizas, conductividad y acidez, que mieles claras, esto demuestra una correlación directa entre los parámetros, lo cual se ve reflejado estadísticamente en un elevado valor del coeficiente de correlación. Además, se detectaron diferencias entre las medias de las localidades estudiadas sólo en el parámetro pH.

BIBLIOGRAFÍA

Anacleto DA, Souza BA, Marchini LC, Moreti AC. 2009. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (Tetragonisca angustula latreille, 1811). Ciência e Tecnologia de Alimentos, 29(3): 535–541.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official methods of the analysis of official analytical chemists. 15th ed vol II. USA.

Baquero L, Stamatti G. 2007. Cría y manejo de abejas sin aguijón. Yerba Buena: Ediciones del Subtrópico. pag 39.

Basilio AM, Spagarino C, Landi L, Achával B. 2013. Miel de Scaptotrigona jujuyensis en dos localidades de Formosa, Argentina. Stingless Bees Process Honey and Pollen in Cerumen Pots, 1–8.

Cauich Kumul R, Ruiz Ruiz JC, Ortíz Vázquez E, Segura Campos MR. 2015. Potencial antioxidante de la miel de Melipona beecheii y su relación con la salud: una revisión. Nutrición Hospitalaria, 32(4): 1432–1442.

CEDIT (Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica). 2005. Material de divulgación. Características y cría de las yateí y otras meliponas. Posadas. pag 58.

Chuttong B, Chanbang Y, Sringarm K, Burgett M. 2016. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). Food Chemistry, 192: 149–155.

Diodato L, Fuster A, Maldonado M. 2008. Valor y beneficios de las abejas nativas, (Hymenoptera: Apoidea), en los bosques del Chaco Semiárido, Argentina. Quebracho, 15: 15–20.

Echigo T, Takenaka T. 1974. Production of Organic Acids in Honey by Honeybees. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 48(4): 225–230.

Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM. 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. Food Chemistry, 100(4): 1649–1653.

Gomes T, Feás X, Iglesias A, Estevinho LM. 2011. Study of organic honey from the Northeast Portugal. Molecules, 16(7): 5374–86.

Isla MI, Craig A, Ordoñez R, Zampini C, Sayago J, Bedascarrasbure E, Alvarez A, Salomón V, Maldonado L. 2011. Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. LWT - Food Science and Technology, 44(9): 1922–1930.

Michener CD. 2007. The Bees of the World. 2nd ed. USA: The Johns Hopkins University Press. pag 953.

Oddo LP, Heard T, Rodríguez-Malaver A, Pérez RA, Fernández-Muiño M, Sancho MT, Sesta G, Lusco L, Vit P. 2008. Composition and antioxidant activity of Trigona carbonaria honey from Australia. Journal of Medicinal Food, 11(4): 789–94.

Pucciarelli AB, Schapovaloff ME, Kummritz S, Señuk IA, Brumovsky LA, Dallagnol AM. 2014. Microbiological and physicochemical analysis of yateí (Tetragonisca angustula) honey for assessing quality standards and commercialization. Revista Argentina de Microbiología, 46(4): 325–32.

Rosso Londoño JM, Nates-Parra G. 2005. Meliponicultura: una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales. LEISA Revista de Agroecología, 21(3): 14–16.

Sgariglia MA, Vattuone MA, Sampietro Vattuone MM, Soberón JR, Sampietro DA. 2010. Properties of honey from Tetragonisca angustula fiebrigi and Plebeia wittmanni of Argentina. Apidologie, 41(6): 667–675.

Sousa JMB, Souza EL, Marques G, Benassi MdeT, Gullón B, Pintado MM, Magnani M. 2016. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. LWT - Food Science and Technology, 65: 645–651.

Spagarino C, Chianetta P, Basilio AM. 2014. Especies arbóreas utilizadas por abejas meliponas (Apidae:

Meliponini) en el bosque chaqueño semiárido en Formosa (Argentina). Rev. Agronomía & Ambiente, 34: 85–91.
Vit P, Gutiérrez MG, Rodríguez-Malaver AJ, Aguilera G, Fernández-Díaz C, Tricio AE. 2009. Comparación de mieles producidas por la abeja yateí (Tetragonisca fiebrigi) en Argentina y Paraguay. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 43(2): 219–226.
Vit P, Medina M, Enríquez ME. 2004. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. Bee World, 85(1): 2–5.
White J. 1975. Composition of honey. En Crane E. Editores. Honey: A Comprehensive Survey. London: Heinemann. pag 180 – 194.
White JW. 1978. Honey. Advances in Food Research, 24: 287–374.

AGRADECIMIENTOS
Agradecimientos al meliponicultor Sr. Ernesto Wagner por el aporte de las muestras de miel para el análisis.

Estudio de parámetros fisicoquímicos y sensoriales de pan francés con agregado de proteínas de soja.

Ruiz MC[1], Rossi MG[1,2], Delorenzi NJ[1], Verdini RA[1,2], Báez GD[1,3]

(1) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Suipacha 531, Rosario, Santa Fe, Argentina.
(2) Instituto de Química Rosario (IQUIR, UNR-CONICET), Suipacha 531, Rosario, Santa Fe, Argentina.
(3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917 3º Piso, Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
gbaez@fbioyf.unr.edu.ar

RESUMEN

Se investigaron las propiedades fisicoquímicas de pan tipo francés en cuya elaboración la harina de trigo fue parcialmente reemplazada por proteínas de soja provenientes de tres fuentes (harina de soja, concentrado de proteínas de soja y aislados de proteínas de soja). La mezcla de harina de trigo y de soja conteniendo un 11% de proteína obtuvo los mejores parámetros farinográficos, con un aumento de 2,5 unidades en la absorción de agua. Además, la estabilidad de la masa presentó un aumento de 5,6 min y se observó una disminución de aproximadamente 40% en el índice de tolerancia al amasado en comparación con el control. Por otro lado, el volumen específico y la textura de la miga no se vieron afectadas significativamente (valor $p \leq 0,05$). La firmeza de la corteza mostró una disminución significativa en la fuerza máxima, probablemente debido al debilitamiento de la red de gluten. En conclusión, estos resultados muestran la potencial aplicación de pan tipo francés como vehículo para la adición de proteína de soja con 11% de concentración de proteínas totales, obteniéndose panes con aspecto y color aceptable, y con propiedades reológicas y de textura adecuadas.

Palabras claves: pan, proteínas, soja, textura.

ABSTRACT

Physicochemical properties of french bread in which wheat flour was partially replaced by soya proteins from three sources (soy flour, soy protein concentrate and soy protein isolated) were investigated. The mixture of wheat flour and soy containing 11% protein showed the best farinograph parameters, with an increase of 2,5 units water absorption. Moreover, the stability of the mass showed an increase of 5,6 min and a decrease of about 40% was observed in the mixing tolerance index compared to control. On the other hand, the specific volume and crumb texture were not significantly affected ($p \leq 0,05$ value). The firmness of the crust showed a significant decrease in maximum strength, probably due to the weakening of the gluten network. In conclusion, these results show the potential application of French bread type as a vehicle for adding soy protein with 11% of total protein concentration, yielding breads with acceptable appearance and color, and with appropriate rheological and texture properties.

Keywords: bread, proteins, soy, texture.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*triticum vulgare*) es uno de los cereales más utilizados en la alimentación humana desde los comienzos de la historia y es considerado símbolo de progreso. Por ser adecuado para producir productos de panadería, entre ellos pan, se lo denomina cereal panificable. Según el Artículo 726 del Capítulo IX del Código Alimentario Argentino (CAA): “Con la denominación de Pan, Pan blanco, Pan francés, o Pan tipo francés, se entiende el producto obtenido por la cocción de una masa hecha con harina, agua potable y sal en

cantidad suficiente, amasada en forma mecánica y fermentada por el agregado de masa agria y/o levaduras".
La soja (*glicyne max*) es una de leguminosa, cuyo uso se encuentra ampliamente difundido, y uno de los principales cultivos en la Argentina, siendo este país el tercer productor mundial luego de Estados Unidos y Brasil (Masuda y Goldsmith 2009). Debido a sus propiedades nutritivas, manifestadas por su contenido de minerales (calcio, hierro, zinc, fósforo y magnesio) y vitaminas (vitaminas A, E y del complejo B: tiamina, niacina y ácido fólico), y especialmente por sus proteínas, es cada vez mayor el desarrollo científico y tecnológico para su aprovechamiento integral (Alvarez-Pedrosa, Astiasarán et al. 2000). La fortificación de alimentos con proteínas ha estado en auge en las últimas décadas, siendo las proteínas de soja una fuente muy importante reconocida por la *Food and Drug Administration* (FDA), la *United States Department of Agriculture* (USDA) y la Subsecretaría de Alimentos y Bebidas del Ministerio de Agroindustria de Argentina. La complementación proteica se logra realizando mezclas entre proteínas que posean distintos aminoácidos limitantes o entre una que posea algún aminoácido limitante con otra completa. Las proteínas del trigo son deficitarias en lisina mientras que las proteínas de la soja son ingredientes interesantes para aumentar el contenido y la calidad proteica debido a su alto valor biológico. Éstas pueden encontrarse en distintas formas: harinas, concentrados, aislados.
Dentro de este contexto, se planteó realizar una fortificación de pan de trigo tipo francés utilizando harina de soja, concentrado de proteínas de soja y aislado de proteínas de soja. El objetivo principal fue determinar el efecto sobre parámetros fisicoquímicos y sensoriales del agregado de distintas fuentes de proteína de soja, y en diferentes concentraciones, al pan francés.

MATERIALES Y MÉTODOS

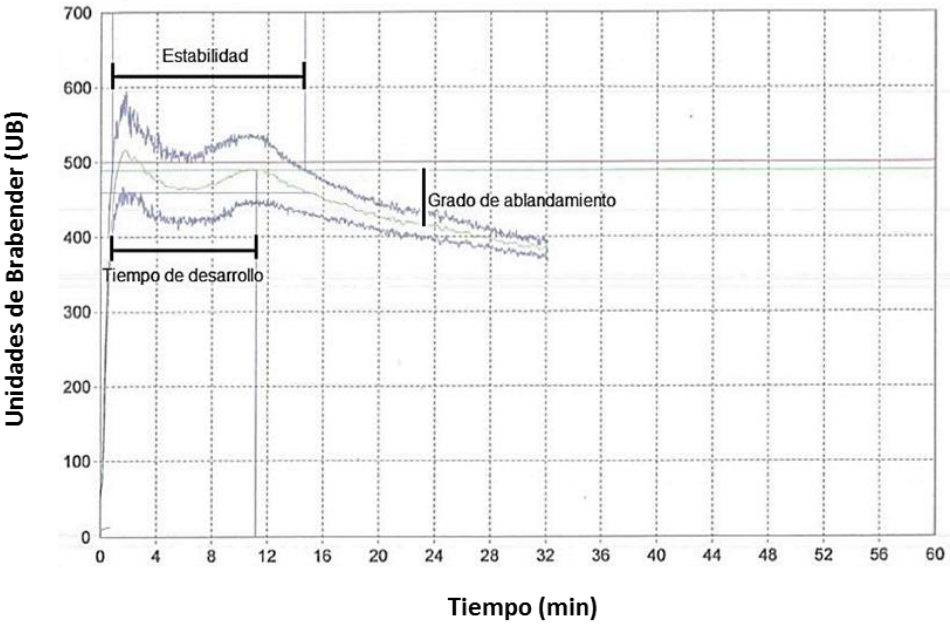
Se realizaron 6 formulaciones de panes tipo francés (**Tabla 1**) reemplazando parcialmente HT con harina de soja (HS), concentrado de proteínas de soja (CS) y aislado de proteínas de soja (AS), cuyo contenido proteico fue de 10, 43, 66 y 94% respectivamente. Los panes realizados con HT y cada fuente de proteína de soja con contenido total de proteínas del 11% p/p se denominaron HS 11%, CS 11% y AS 11%, respectivamente. Por su parte, los panes realizados con HT y cada fuente de proteína de soja con contenido total de proteínas del 22% p/p se denominaron HS 22%, CS 22% y AS 22%. Como control se elaboró una pan con 100% de HT (HT).

Tabla 1. Formulaciones con distintos porcentajes de harina de trigo y de fuente de proteína de soja.

	Harina de trigo (%)	**Fuente de proteína de soja (%)**
HT	100	0
HS 11%	93	7
CS 11%	96	4
AS 11%	97	3
HS 22%	57	43
CS 22%	75	25
AS 22%	81	19

Los ensayos farinográficos se realizaron a las formulaciones mencionadas en la **Tabla 1** utilizando un farinógrafo de Brabender (Farinograph E, Duisburg, Alemania) de acuerdo con la norma IRAM 15855. Inicialmente, se realizó una curva de dosificación con el fin de determinar la cantidad de agua absorbida por la harina necesaria para obtener una masa con una consistencia de 500 Unidades de Brabender (UB) (Rossi 2016). Luego se colocaron 300 g de muestra más la cantidad de agua determinada según la curva de dosificación y se amasó durante el tiempo necesario para alcanzar el desarrollo óptimo de la masa. Así, se obtuvo el farinograma correspondiente (**Figura 1**), que representa la resistencia que opone la masa al trabajo mecánico continuo en función del tiempo, y se pudieron obtener los parámetros de interés.

Figura 1. Farinograma de Brabender y parámetros de interés.



Para la panificación del control (HT) se siguió una receta de pan francés tradicional: 450 g de harina de trigo + 9 g de levadura virgen CALSA (El Manantial, Tucumán, Argentina) + 9 g de sal fina Celusal (Esmeralda, Buenos Aires, Argentina) + 243 mL de agua. Los panes con agregado de proteína de soja fueron elaborados siguiendo esta receta pero reemplazando la HT por la mezcla respectiva según se indica en la **Tabla 1**. La cantidad de agua agregada tanto para el pan control como para el resto de las formulaciones fue la calculada a partir de los resultados del ensayo de calidad panadera.

El proceso de panificación se realizó mediante el mezclado de todos los ingredientes, el amasado seguido de una primera fermentación en una máquina de pan (ATMA, HP4060E, China) durante 55 min. Luego, se dividió la masa en tres bollos de 200 g cada uno y se los dejó reposar tapados durante 15 min. A continuación, se laminaron los bollos con una sobadora (Sol Real, Argentina) y se procedió al armado de las piezas. Las piezas se colocaron en una bandeja de aluminio y se llevaron a estufa (Dalvo, DHACEL CD 101, Argentina) a una temperatura 5°C mayor que la temperatura de la masa y manteniendo una humedad del 80% para el segundo leudado, hasta duplicación del volumen de las piezas. Finalmente, los panes se hornearon en horno eléctrico (Zonda, Rosario, Argentina) a 180°C durante 26 min y se dejaron enfriar.

El peso de los panes se registró en balanza analítica. El volumen panadero se midió por el método de desplazamiento de semillas de mijo en un recipiente cilíndrico según la norma AACC 10-50 con algunas modificaciones. Por su parte, el volumen específico se calculó como el cociente entre el volumen panadero y el peso del pan.

Para todos los ensayos de textura se utilizó un texturómetro (Mecmesin, Multitest 2.5-d, Slinfold, West Sussex, Inglaterra) equipado con una celda de carga AFG 100N. Para el ensayo de punción se utilizó una sonda cilíndrica de borde plano de 45 mm de largo y 1 mm de diámetro adaptado a la celda del texturómetro y se procedió a la penetración de la corteza de los panes a una velocidad de 100 mm/min, registrándose una curva de fuerza versus desplazamiento. La compresión se realizó con un émbolo plano de 36 mm de diámetro adaptado a la celda del texturómetro con una compresión del 40% a una velocidad de 100 mm/min, siguiendo la metodología de la norma AACC 74-09. El ensayo de compresión relajación se realizó sobre las migas de todos los panes elaborados, utilizándose un émbolo plano de 36 mm de diámetro adaptado a la celda del texturómetro. En primer lugar, se comprimió la muestra a una velocidad de celda de 30 mm/min,

hasta alcanzar los 5 mm de desplazamiento. En esta primera etapa la fuerza aumentó de forma abrupta y casi lineal. Luego, se detuvo la celda y se estudió la relajación de la miga durante 5 minutos. Así, se registró una curva de fuerza en función del tiempo. La caída de la fuerza bajo la acción de una tensión constante es lo que se conoce como relajación de esfuerzo (Bourne 2014). Los ensayos de análisis de perfil de textura se realizaron usándose un émbolo plano de 36 mm de diámetro adaptado a la celda del texturómetro. Las muestras se sometieron a una compresión máxima del 40% a una velocidad de celda de 30 mm/min.
Para la adquisición de las imágenes digitales se utilizó la metodología descripta por (Soazo, Báez et al. 2015) que consiste en la utilización de una caja de luz de madera color blanco con cuatro tubos fluorescentes Osram, Biolux, 18W/965 (Osram, Alemania) en la parte superior, con una temperatura de color de 6500 K (D65, luz de día utilizada en investigación de alimentos). Las imágenes se tomaron con una cámara digital Canon Eos Rebel T3 (Taiwan). Las muestras fueron fotografiadas sobre un fondo negro bajo la siguiente configuración de la cámara digital: modo manual, apertura de la lente f=8, tiempo de exposición 1/200, sin flash, sensibilidad ISO 400, resolución máxima (5184 x 3456) y almacenamiento en formato RAW. Para la calibración del color se utilizó la tarjeta de color it8 (Wolf Faust, Alemania) con la cual se le obtuvo el perfil ICC empleando el programa LProf. Este perfil fue asignado a todas las imágenes utilizando el programa Photoshop (Adobe Systems, Inc., San José, California, Estados Unidos). Luego se obtuvieron los parámetros L, a y b desde la ventana de histogramas del programa Photoshop. Por último, dichos parámetros fueron convertidos en L*, a* y b* (Yam y Papadakis 2004). Además, relacionando estos tres parámetros se calculó el índice de pardeamiento (IP), el cual permite obtener una medida de la pureza del color marrón.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 2** se muestran los parámetros farinográficos de las diferentes mezclas de harinas evaluadas. Para HS 11% se halló un leve aumento en los parámetros absorción de agua y estabilidad, comparando con el control. Además, se destaca un decaimiento en el parámetro grado de ablandamiento para HS 11%. Por su parte, AS 11% mostró valores similares el control. Por otro lado, se puede observar que las mezclas con contenido proteico de 22% mostraron parámetros farinográficos muy alejados del control.

Tabla 2. Parámetros obtenidos a partir de los farinogramas de Brabender.

	Absorción de agua (%)	**Tiempo de desarrollo (min)**	**Estabilidad (min)**	**Grado de ablandamiento (UB)**
HT	$54,4 \pm 0,1^{a}$	$12,0 \pm 0,1^{a}$	$16,3 \pm 0,2^{a}$	61 ± 1^{c}
HS 11%	$56,9 \pm 0,3^{b}$	$14,7 \pm 0,3^{a}$	$21,9 \pm 1,0^{b,c}$	$36 \pm 4^{a,b}$
CS 11%	$58,4 \pm 0,2^{b}$	$14,7 \pm 0,3^{a}$	$18,7 \pm 0,5^{a,b}$	56 ± 1^{c}
AS 11%	$56,1 \pm 1,7^{a,b}$	$12,4 \pm 1,6^{a}$	$16,6 \pm 3,6^{a}$	58 ± 10^{c}
HS 22%	$70,2 \pm 0,7^{c}$	$36,6 \pm 0,9^{b}$	$36,4 \pm 1,8^{d}$	45 ± 1^{b}
CS 22%	$72,5 \pm 0,6^{d}$	$45,2 \pm 6,3^{c}$	$54,6 \pm 1,7^{e}$	44 ± 4^{b}
AS 22%	$71,3 \pm 1,7^{c,d}$	$32,0 \pm 2,9^{b}$	$23,5 \pm 1,8^{c}$	26 ± 3^{a}

Las letras diferentes significan que hay diferencias significativas en los valores ($p<0,05$). Todas las mediciones se realizaron por cuatriplicado.

Con respecto al volumen específico, los panes con 11% de proteínas no tuvieron diferencias significativas respecto del control (**Tabla 3**). Visentín et al. (2009) describieron un comportamiento similar al trabajar con un reemplazo del 6% de la harina de trigo con harina de soja. Sin embargo, el volumen específico disminuyó significativamente para los panes con 22% de proteínas, lo cual se vio evidenciado en una miga más apelmazada y sin buena estructura de alvéolos. Dicha pérdida de volumen específico por la adición de ingredientes de soja a estos niveles concuerda con lo obtenido por diferentes autores (Ribotta, Arnulphi et al.

2005, Lodi y Vodovotz 2008, Vodovotz 2008).

Tabla 3. Peso, volumen panadero y volumen específico medidos y calculado para los distintos panes elaborados (promedio ± desvío estándar).

	Peso (g)	**Volumen panadero (mL 10^{-2})**	**Volumen específico (mL/g)**
HT	171,3 ± 0,8^{b}	5,1 ± 0,1^{b}	3,0 ± 0,1^{b}
HS 11%	174,6 ± 0,6^{c}	5,0 ± 0,4^{b}	2,7 ± 0,2^{b}
CS 11%	172,4 ± 0,1^{b,c}	5,2 ± 0,1^{b}	3,0 ± 0,1^{b}
AS 11%	172,5 ± 0,5^{b,c}	5,0 ± 0,3^{b}	2,7 ± 0,1^{b}
HS 22%	167,0 ± 0,9^{a}	2,1 ± 0,1^{a}	1,3 ± 0,1^{a}
CS 22%	170,3 ± 0,8^{b}	2,2 ± 0,2^{a}	1,3 ±0,1^{a}
AS 22%	172,5 ± 0,7^{b,c}	2,5 ± 0,3^{a}	1,5 ± 0,2^{a}

Las letras diferentes significan que hay diferencias significativas en los valores ($p<0,05$). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

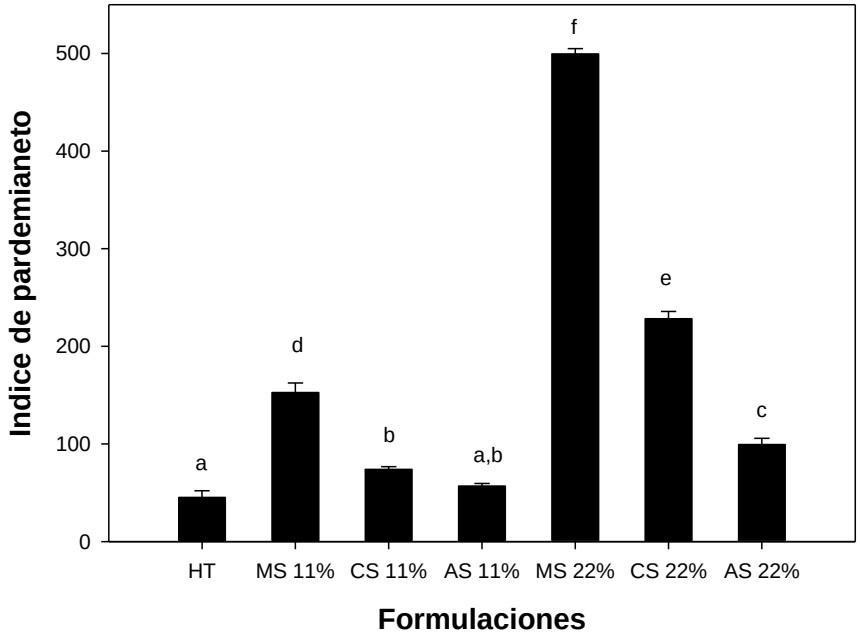
En la **Figura 2** se pueden observar las fotografías de los panes elaborados. Desde el punto de vista visual, los panes control (HT) y con 11% de proteínas poseen una estructura de la corteza continua y agradable. Si bien los productos con adición de proteína de soja son utilizados para mejorar el color de la corteza de productos de panificación (Nilufer-Erdil, Serventi et al. 2012), esto depende del producto deseado y las proporciones de la sustitución utilizada. Con respecto al color de los panes al 11%, se obtuvo un aumento leve en CS y un aumento importante para HS Por su parte, los panes con 22% de proteínas resultaron con cortezas heterogéneas, especialmente HS 22% que mostró manchas oscuras y AS 22% que presentó sectores discontinuos en la corteza. La excepción es CS 22%, con color y apariencia agradables. En el caso de la harina de soja, para ambas concentraciones, se acentúa el aumento de color. Muchos factores diferentes afectan el color de la corteza, que aparece durante la cocción, debido a la reacción de Maillard, la cual se basa en una reacción entre las proteínas y los azúcares presentes en la masa que produce un pardeamiento no enzimático. La reacción se inicia cuando la temperatura de la superficie del producto es superior a 115°C y ocurre una vez que el agua se evapora lo suficiente de la superficie de la corteza, por lo que requiere de sólo unos pocos minutos de exposición al calor en el horno antes de que suceda (Cauvain y Young 2008). La alta proporción de azúcares (sacarosa, estaquiosa y rafinosa) presente en las muestras de harina de soja ha de ser la responsable de los cambios hallados. Además, se sabe que el aminoácido lisina es el más reactivo para dar reacciones de Maillard, y este aminoácido está presente en grandes cantidades en la soja (Dergal 2006).

Figura 2. Imágenes de los panes obtenidos para cada formulación realizada.

En la **Figura 3** se muestra un gráfico de barras que muestra índice de pardeamiento. Los aumentos obtenidos

en el índice de pardeamiento no son necesariamente contraproducentes, puesto que podrían estar mejorando el parámetro sensorial visual. Dicho aumento de la coloración también fue observado por (Schmiele, Ferrari Felisberto 2017).

Figura 3. Gráfico de barras y errores para el índice de pardeamiento de todos los panes formulados.



Las letras diferentes significan que hay diferencias significativas en los valores ($p<0,05$). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Del análisis de los resultados de texturometría de la corteza, dentro del nivel de concentración proteico del 11%, se observa que todas las muestras presentaron una disminución de la fuerza máxima (**Tabla 4**), hecho que puede deberse al debilitamiento de la red de gluten (Lodi y Vodovotz 2008). Al comparar las del 11% con las del 22% se observa el aumento de la fuerza máxima. Aquí, el mencionado debilitamiento de la red podría ser compensado por la formación de compuestos de mayor dureza durante la reacción de Maillard.

Tabla 4. Parámetros obtenidos del análisis de punción realizado sobre la corteza de los panes formulados (promedio ± desvío estándar).

	Fuerza máxima (N)
HT	$3,2 \pm 0,7^{c,d}$
HS 11%	$1,5 \pm 0,3^{b}$
CS 11%	$0,8 \pm 0,1^{a}$
AS 11%	$0,8 \pm 0,3^{a,b}$
HS 22%	$6,5 \pm 0,4^{e}$
CS 22%	$3,4 \pm 0,6^{d}$
AS 22%	$2,6 \pm 0,5^{c}$

Las letras diferentes significan que hay diferencias significativas en los valores ($p<0,05$). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

En la **Tabla 5** se muestra el resultado del análisis de compresión realizado sobre las migas. Como puede verse, las formulaciones HS 11%, CS 11% y AS 11% no presentaron diferencias significativas en sus valores de firmeza con respecto a HT. Las formulaciones CS 22% y AS 22%, por su parte, presentaron valores notoriamente mayores para este parámetro. Estudios previos (Ribotta, Arnulphi et al. 2005, Vodovotz 2008) han demostrado una relación inversa entre el volumen de la masa de pan y la firmeza, probablemente debido

al apelmazamiento de las muestras derivadas de panes de bajo volumen. La relación entre el volumen específico (**Tabla 3**) y la firmeza determinada en este estudio (**Tabla 5**) refuerza este punto de vista.

Tabla 5. Parámetros obtenidos del análisis de compresión de las migas de los panes (promedio ± desvío estándar).

	Firmeza (N)
HT	12 ± 2[a]
HS 11%	16 ± 3[a]
CS 11%	14 ± 1[a]
AS 11%	14 ± 1[a]
HS 22%	-
CS 22%	48 ± 1[c]
AS 22%	41 ± 1[b]

Las letras diferentes significan que hay diferencias significativas en los valores ($p<0,05$). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

En la **Tabla 6** pueden observarse los resultados del ensayo de compresión y relajación realizados sobre las migas de los panes elaborados. El parámetro del módulo asintótico de equilibrio (EA) representa una medida de la "solidez" de la miga (Verdini y Rubiolo 2002). Puede verse que en todas las formulaciones con un 11% de proteínas se obtuvieron valores que no difirieron significativamente del valor del control. Para las formulaciones con un 22% de proteínas se vio que este parámetro aumentó más de cuatro veces. Esto indicaría que las migas de estas formulaciones son más "sólidas" que las del control, es decir, presentan una mayor habilidad para mantener el esfuerzo para una dada deformación a lo largo del tiempo.

Tabla 6. Módulo asintótico de equilibrio (EA) obtenido del ensayo de compresión y relajación de las migas de los panes (promedio ± desvío estándar).

	EA (Pa 10^{-4})
HT	1,8 ± 0,3[a]
HS 11%	2,1 ± 0,4[a]
CS 11%	2,0 ± 0,4[a]
AS 11%	2,0 ± 0,2[a]
HS 22%	-
CS 22%	9,3 ± 0,3[b]
AS 22%	8,1 ± 0,9[b]

Las letras diferentes significan que hay diferencias significativas en los valores ($p<0,05$). Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. La muestra HS 22% no pudo medirse debido a su a su tamaño.

Los resultados del análisis de perfil de textura realizado sobre las migas de los panes elaborados se muestran en la **Tabla 7**. Dentro del nivel de concentración proteico del 11% todas las muestras fueron homogéneas para todos los parámetros estudiados. Se busca en la miga una cohesividad elevada, puesto que esto se relaciona con una miga que no se desgrana fácilmente durante la compresión; es decir, que los componentes de la miga se han integrado adecuadamente durante la cocción. Por lo tanto, la dureza que presenta la miga del pan está inversamente relacionada con el volumen de la pieza. Como se demostró anteriormente, podemos ver que el menor volumen de las piezas puede ser el responsable del aumento significativo de la dureza para las composiciones del 22%. Por otro lado, en general, la masticabilidad varía en el mismo sentido que la dureza. Es decir, migas más duras presentan mayor masticabilidad, lo que se traduce en una mayor fuerza de masticación. En estos casos esto también se cumple, con excepción de la formulación CS 22% que resultó ser homogénea en el parámetro de masticabilidad con respecto a HT.

Tabla 7. Parámetros obtenidos del análisis de perfil de textura de las migas de los panes (promedio ± desvío estándar).

	Cohesividad	Dureza (N)	Elasticidad	Masticabilidad (N)
HT	0,6 ± 0,1[a,b]	21 ± 5[a]	0,9 ± 0,1[a]	12 ± 2[a,b]
HS 11%	0,7 ± 0,1[b]	19 ± 3[a]	0,9 ± 0,1[a]	12 ± 1[a,b]
CS 11%	0,7 ± 0,1[a,b]	15 ± 3[a]	0,9 ± 0,1[a]	9 ± 1[a,b]
AS 11%	0,8 ± 0,1[b]	12 ± 2[a]	0,9 ± 0,1[a]	9 ± 1[a]
HS 22%	-	-	-	-
CS 22%	0,5 ± 0,2[a]	67 ± 8[b]	0,8 ± 0,2[a]	26 ± 14[b,c]
AS 22%	0,6 ± 0,1[a,b]	70 ± 10[b]	0,8 ± 0,1[a]	35 ± 6[c]

Las letras diferentes significan que hay diferencias significativas en los valores ($p<0,05$). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

CONCLUSIONES

Por estudios farinográficos se pudo conocer ciertas características reológicas de las masas, destacándose el aumento de la absorción de agua y la estabilidad para HS 11%.

Se pudieron medir parámetros de interés de los panes como el peso y el volumen panadero, y correlacionarse para obtener el volumen específico de cada pan. Con respecto a este último parámetro, para los panes con 11% de proteínas finales no se vieron diferencias significativas con el control. Sin embargo, el volumen específico disminuyó significativamente para los panes con 22% de proteínas, lo cual se vio evidenciado en una miga más apelmazada y sin buena estructura de alvéolos.

Respecto al ensayo de textura realizado sobre la corteza de los panes, se vio una disminución significativa de la fuerza máxima para las formulaciones con valor proteico del 11% debida al debilitamiento de la red de gluten. Este debilitamiento se vio compensado en los panes con 22% de proteínas, notándose un gran incremento del parámetro para la formulación HS 22%. Probablemente esto se deba a la formación de compuestos que otorgarían una mayor dureza a la corteza producto de las reacciones de Maillard.

La textura de las migas de los panes elaborados también pudo estudiarse satisfactoriamente. No se vieron diferencias significativas respecto del control para las formulaciones con 11% de proteínas en ninguno de los parámetros estudiados. En cambio, las migas de los panes con contenido proteico de un 22% presentaron un aumento significativo en los parámetros de firmeza, dureza, gomosidad, masticabilidad y módulo asintótico de equilibrio.

El color pudo estudiarse de manera objetiva con la utilización del análisis digital de imágenes, encontrándose una mejora general de este parámetro para todos los panes, a excepción de la formulación HS 22% que, por su elevado índice de pardeamiento debido a la gran cantidad de reacciones de Maillard ocurridas durante la cocción, no exhibió un aspecto agradable.

Finalmente, se concluye que pudo utilizarse al pan francés como vehículo para el agregado de proteínas de soja y formular un producto con una concentración de proteínas finales del 11% con buen aspecto y buenas propiedades reológicas, texturales y de color. Algunas de estas propiedades no presentaron diferencias significativas respecto del control y otras mejoraron.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Pedrosa CS, Astiasarán I, Martínez JA, Gómez RC. 2000. Alimentos: composición y propiedades, McGraw-Hill Interamericana.

Bourne MC. 2014. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement, Elsevier Science.

Cauvain SP y Young LS. 2008. Baked Products: Science, Technology and Practice, Wiley.

Dergal SB. 2006. Química de los alimentos, Pearson Educación.
Lodi A, Vodovotz Y. 2008. Physical properties and water state changes during storage in soy bread with and without almond. Food Chemistry 110(3): 554-561.
Masuda T, Goldsmith PD. 2009. World soybean production: Area harvested, yield, and long-term projections. International Food and Agribusiness Management Review 12(4): 143-162.
Nilufer-Erdil D, Serventi L, Boyacioglu D, Vodovotz Y. 2012. Effect of soy milk powder addition on staling of soy bread. Food Chemistry 131(4): 1132-1139.
Ribotta PD, Arnulphi SA, León AE, Añón MC. 2005. Effect of soybean addition on the rheological properties and breadmaking quality of wheat flour. Journal of the Science of Food and Agriculture 85(11): 1889-1896.
Rossi M. 2016. Formulación de un pan fortificado que permita ofrecer una fuente económica de calcio, Universidad Nacional de Rosario.
Schmiele M, Ferrari Felisberto MH, Pedrosa Silva Clerici MT, Chang YK. 2017. Mixolab™ for rheological evaluation of wheat flour partially replaced by soy protein hydrolysate and fructooligosaccharides for bread production. LWT - Food Science and Technology 76, Part B: 259-269.
Soazo M, Báez G, Barboza A, Busti PA, Rubiolo A, Verdini R, Delorenzi NJ. 2015. Heat treatment of calcium alginate films obtained by ultrasonic atomizing: Physicochemical characterization. Food Hydrocolloids 51: 193-199.
Verdini RA, Rubiolo AC. 2002. Texture Changes During the Ripening of Port Salut Argentino Cheese in 2 Sampling Zones. Journal of Food Science 67(5): 1808-1813.
Visentín AN, Drago SR, Osella CA, de la Torre MA, Sánchez HD, González RJ. 2009. Efecto de la adición de harina de soja y concentrado proteico de suero de queso sobre la calidad del pan y la dializabilidad de minerales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 59: 325-331.
Vodovotz Y. 2008. 16 - Soy-enriched bread A2 - Hamaker, Bruce R. Technology of Functional Cereal Products, Woodhead Publishing: 388-408.
Yam KL, Papadakis SE. 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. Journal of Food Engineering 61(1): 137-142.

Extracción de fibra dietaria soluble asistida por enzimas, a partir de residuos de alcaucil

Santo Domingo C.[1,2], Soria M.[3], Rojas A.M.[1,2], Fissore E.N.[1,2] y Gerschenson L.N.[1,2]

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
(2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)
(3) Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales—INBA (CONICET), Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
eliana@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se evaluó la acción de las enzimas proteasa y hemicelulasa para la extracción de fibra dietaria soluble, a partir de brácteas y tallo de *Cynara cardunculus*. Se utilizó un diseño experimental simplex de 2 factores comprendiendo las concentraciones de proteasa entre 0-200 µL y de hemicelulasa entre 0-200 mg, en un tratamiento enzimático de 5 hs a 40ºC. Se determinó el contenido de carbohidratos totales, ácidos urónicos, inulina, proteínas y compuestos fenólicos y se evaluó el rendimiento de las distintas fracciones de fibra dietaria aisladas. Se observó que el rendimiento y la composición química de las fracciones, fueron influenciados por el tejido utilizado (tallos, brácteas) y por la concentración de hemicelulasa y proteasa, obteniéndose los mayores rendimientos y contenidos de carbohidratos cuando se utilizaron las mayores concentraciones de enzimas. En general, los rendimientos y los contenidos de proteína, inulina y polifenoles, fueron mayores en las fracciones aisladas a partir de tallo. De este modo, mediante la extracción asistida por enzimas, se obtuvieron fracciones de fibra dietaria soluble a partir de residuos de alcaucil, contribuyendo a mejorar la sustentabilidad del procesamiento industrial.

Palabras clave: *Cynara cardunculus*, pectina, inulina, hemicelulasa, proteasa.

ABSTRACT

It was evaluated the performance of hemicellulase and protease enzymes for the extraction of soluble dietary fiber from *Cynara cardunculus* bracts and stems. Using a two-factor simplex experimental design comprising protease (0-200 µL) and hemicellulase (0-200 mg) concentrations through an enzymatic treatment of 5 h at 40°C. Total carbohydrate, uronic acids, inulin, proteins and phenolic compounds contents were determined and the yield of the different dietary fiber fractions isolated was evaluated. It was observed that the yield and the chemical composition of fractions were influenced by the tissue used (stems, bracts) and the concentration of hemicellulase and protease obtaining higher yields and carbohydrate contents when higher concentrations of enzymes were used. In general, yields and protein, inulin and polyphenols contents were higher in fractions isolated from stem. Therefore, enzyme-assisted extraction-allowed to obtain soluble dietary fiber fractions from artichoke byproducts, helping to improve the sustainability of industrial processing.

Keywords: *Cynara cardunculus*, pectin, inulin, hemicellulase, protease.

INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria controla el proceso de selección, limpieza y preparación de materias primas vegetales para su posterior procesamiento industrial (FAO 2014), dando lugar a residuos que podrían ser reutilizados, ya que son una buena fuente de fibra alimentaria y fotoquímicos (Goñi y Hervert-Hernández 2011).

Para las empresas alimentarias, el tratamiento de residuos vegetales y su posterior eliminación representan costos importantes. La transformación de estos residuos en productos con un mayor valor agregado les permitiría reducir el costo del tratamiento y generar beneficios adicionales, contribuyendo a un desarrollo sostenible y además, a la protección del ambiente.

El alcaucil (*Cynara cardunculus* var. s*colymus*) es una especie de cardo cultivado con fines alimenticios. La porción comestible de la planta está constituída por los capullos de las flores antes que las mismas entren en la etapa de floración. Es una planta perenne nativa de la región mediterránea (Christaki et al. 2012) para la cual la relación de fracción comestible a biomasa total es muy baja, siendo menor del 15% -20%. *Cynara cardunculus* es una fuente rica de compuestos fenólicos bioactivos, así como de inulina, otras fibras y minerales (Orlovskaya et al. 2007, Ruiz-Cano et al. 2014) por lo cual el alcaucil es considerado un alimento funcional. Los tejidos vegetales desechados durante la cosecha o después de la transformación industrial de esta planta constituyen una fuente valiosa y renovable de biopolímeros y compuestos bioactivos. La extracción, el fraccionamiento y el aislamiento de compuestos de alto valor agregado a partir de residuos de alimentos se pueden realizar a través de diferentes metodologías (Galanakis 2012).

La inulina es un carbohidrato de reserva el cual está compuesto por unidades de fructosa, fundamentalmente. Como las enzimas humanas no pueden digerir los fructanos, éstas alcanzan el colon y sirven como sustrato para el crecimiento de enterobacterias. Las dietas que contienen fructanos estimulan selectivamente las bacterias lácticas (Roberfroid 2007), produciendo un aumento en el contenido de ácidos grasos de cadena corta y una disminución de la concentración de sustancias promotoras de tumores, tales como amoniaco (Gallaher et al. 1996, Heyer et al. 1999). Así, la inulina ha sido asociada con el mejoramiento del sistema gastrointestinal e inmunológico por su funcionamiento como prebiótico. Además, se ha demostrado que aumenta la absorción de calcio y magnesio, influye en la formación de glucosa en la sangre, y reduce los niveles de colesterol y de lípidos séricos (Slavin 2013).

Las pectinas son un tipo de fibra soluble comúnmente presente en los tejidos vegetales. Los polisacáridos pécticos son macromoléculas bioactivas que consisten sobre todo en polímeros ricos en ácido galacturónico (GalA) y, a menudo contienen cantidades significativas de ramnosa, arabinosa y galactosa, así como otros 13 diferentes monosacáridos. La red de pectina debe ser interrumpida parcialmente para permitir la extracción de biopolímeros de pared celular a través del uso de agentes de quelación de calcio, álcali diluido, ácido diluido, o enzimas que degraden la pared celular. Se ha sugerido que la digestión enzimática es un método de extracción amigable con el medio ambiente que contribuye a la sustentabilidad de los procesos involucrados (Maxwell et al. 2012).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de las enzimas proteasa y hemicelulasa para la extracción de fracciones enriquecidas en fibra dietaria soluble, a partir de brácteas y tallos de alcaucil, con el fin de contribuir a su utilización a través de la obtención de productos de valor agregado que se puedan utilizar en la industria alimenticia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la fracción enriquecida en material de pared celular (CWM)

Se utilizaron alcauciles (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) adquiridos en un mercado local. Se separaron el tallo (T), las brácteas (B) y el corazón. Mediante un extractor doméstico de jugo, se extrajo el mismo de T y B y se lo descartó. Por otro lado, cada residuo sólido se secó en estufa con convección a 85°C durante 2,5 horas (velocidad del aire: 0,5 m/s). El residuo seco se molió en un molinillo doméstico (Wemir E 909, Argentina) y constituyó la fracción enriquecida en material de pared celular (CWM) de tallos y brácteas.

Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR)

De acuerdo a Martin-Cabrejas *et al*. (1994), a 100 g de CWM de tallo o brácteas de alcaucil se le agregaron 350 ml de etanol 80% (v/v), se llevó a ebullición durante 30 minutos con agitación constante y se filtró descartando el líquido. Al residuo se le agregaron 350 ml de etanol 80% (v/v) y se mantuvo en ebullición 15 minutos. Se filtró, descartando el líquido y se realizaron 2 calentamientos de 15 minutos con 250 ml de

etanol 80% (v/v) en ebullición cada uno. El residuo se lavó dos veces, primero con 100 ml de etanol 80% (v/v) y el segundo con 100 ml de etanol 96% (v/v). El residuo filtrado se liofilizó (congelación con N_2 líquido; sublimación a presión de cámara de 1000 µm Hg y temperatura de bandeja de 25°C) y luego se molió, constituyendo la fracción AIR.

Aislamiento de las fracciones de fibra dietaria soluble

Debido a que la pectina es inestable a pH por encima de 5,0 cuando se expone a temperaturas elevadas (Voragen et al. 2001), la inulina es estable a pH 5,0 – 7,0 en el intervalo de temperatura de 20 - 70°C (Denglin et al. 2001) y considerando la sensibilidad a la temperatura y la acidez de las enzimas utilizadas (Motamedzadegan et al. 2010, Wang et al. 2010, Hassan et al. 2013), se decidió trabajar a un pH de 5,2 y a una temperatura no superior a 50°C. De acuerdo, a los puntos previamente enumerados se realizó un diseño experimental, teniendo como punto central del diseño las siguientes condiciones: temperatura = 40°C, tiempo = 5 horas, pH = 5,2.

Los AIRs (5 g) obtenidos a partir de tallo y de brácteas, fueron sometidos a digestión bajo agitación (10 rad. s^{-1}) en 500 ml de solución de buffer citrato de sodio 0,05 M, pH 5,2 con azida de sodio 0,01% (p/p) con el agregado de diferentes concentraciones de enzimas hemicelulasa (0-200 mg) y/o proteasa (0-200 µL).

Finalizada la digestión enzimática, los sistemas fueron filtrados y a cada sobrenadante, se le adicionaron dos volúmenes de etanol 96 % (v/v) para precipitar la fibra soluble, que se separó filtrando con membrana de fibra de vidrio. El residuo sólido se liofilizó en las condiciones descriptas previamente.

Las enzimas utilizadas fueron: hemicelulasa de *Aspergillus Niger* H2125 y proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens* P1236 (Sigma Aldrich, EE UU).

Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar el efecto de los factores estudiados (concentración de proteasa y/o hemicelulasa) sobre las variables respuesta (rendimiento y composición química de las fracciones), se utilizó el diseño que se detalla en la **Tabla 1**. Los niveles de concentración de enzima fueron organizados de acuerdo a un diseño simplex de dos factores proyectado a partir de una estrella y un diseño central compuesto (Montgomery 2008). En un diseño simplex de dos factores, los valores alfa de los puntos estrella tienen un rango de [-√(2)/2; +√(2)/2], en lugar de [-√(2); +√(2)], como en un diseño central compuesto convencional.

Los factores tomaron los siguientes valores expresados en forma codificada y, entre paréntesis, en forma no codificada. Para proteasa: -1 (0 µL), -α (30 µL), 0 (100 µL), + α (170 µL) y 1 (200 µL). Para hemicelulasa: -1 (0 mg), -α (30 mg), 0 (100 mg), + α (170 mg) y 1 (200 mg).

Tabla 1. Diseño Experimental

	Valor Codificado		**Valor sin codificar**	
Tratamiento	**Proteasa**	**Hemicelulasa**	**Proteasa** (µL)	**Hemicelulasa** (mg)
1	-1	-1	0	0
2	1	-1	200	0
3	-1	1	0	200
4	1	1	200	200
5	α	0	170	100
6	-α	0	30	100
7	0	α	100	170
8	0	-α	100	30
9*	0	0	100	100
10*	0	0	100	100
11*	0	0	100	100

*Punto Central.

α valor alfa = [√ (2)/2].

Evaluación del rendimiento

El rendimiento de cada fracción se expresó como gramos de producto obtenido por cada 100 g de AIR utilizado.

Determinación de hidratos de carbono en AIR y CWM

La determinación del contenido de hidratos de carbono no celulósicos, celulosa y lignina se realizó mediante la hidrólisis con ácido sulfúrico de acuerdo a Ng et al. (1998).

La determinación se realizó pesando, aproximadamente, 0,3 g de muestra (CWM o AIR) en 2080 µl de solución de ácido sulfúrico 72% (p/p) durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se agregó suficiente cantidad de agua desionizada de manera de tener una concentración final 1 M en ácido sulfúrico (~ 25 ml). Cada muestra fue luego calentada a 100ºC durante 2,5 horas en un baño de agua. La dispersión resultante fue enfriada, centrifugada durante 10 min a 12000 x g y, finalmente, se separó el sobrenadante. El mismo se neutralizó cuidadosamente y el contenido de hidratos de carbono totales (celulósicos y no celulósicos) se determinó por el método del fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956). El residuo se lavó tres veces con agua deionizada, se centrifugó durante 10 min a 12000 x g y, finalmente, se liofilizó para luego pesarlo e informarlo como lignina.

Se llevó a cabo un segundo procedimiento con otra porción de ~ 0,3 g de cada muestra a las cuales se les agregó 2080 µl de solución 72% (p/p) de ácido sulfúrico; se dispersó el material y se agregó agua inmediatamente para alcanzar una dilución final en ácido sulfúrico 1 M, seguida de calentamiento por 2,5 horas a 100ºC. Se procedió a continuación igual que en el caso anterior. El residuo final obtenido y pesado corresponde a celulosa y lignina, por lo tanto los hidratos de carbono totales contenidos en el sobrenadante estaban constituidos por polisacáridos no celulósicos.

El tercer procedimiento de hidrólisis se llevó a cabo con otra porción ~ 0,3 g de cada muestra, seguida por la técnica aplicada durante el segundo procedimiento pero, en este caso, se aplicó una hora de calentamiento a 100ºC en un baño de agua. Sólo se separó el sobrenadante para la cuantificación como se indicó previamente, determinándose el contenido de ácidos urónicos por el método espectrofotométrico de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991).

Determinación de carbohidratos totales

La determinación de carbohidratos totales de realizó según el método de Dubois et al. (1956) que utiliza fenol – ácido sulfúrico, midiendo la absorbancia del sistema a 490 nm y utilizando fructosa para la curva estándar.

Determinación de ácidos urónicos

La determinación de ácidos urónicos se realizó mediante la técnica reportada por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991), se evaluó la absorbancia a 525 nm y la curva de calibración se realizó con una solución estándar de ácido galacturónico.

Determinación de proteínas

El contenido proteico se determinó en el sobrenadante obtenido del primer procedimiento mediante el ensayo de Lowry et al. (1951). Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar y la lectura se realizó a 660 nm.

Determinación de inulina

La determinación del contenido de inulina se realizó por el método 999.03 propuesto por la AOAC (Quemener et al. 1993) utilizando un conjunto de reactivos adecuados para determinar fructanos (Fructan Assay Procedure, Megazyme, Irlanda).

Determinación de polifenoles totales

Para la determinación del contenido de polifenoles totales se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965, Bunzel et al. 2000). Se evalúo la absorbancia a 765 nm y se utilizó una solución de ácido gálico como estándar para la curva de calibración.

Análisis estadístico

El análisis de regresión y el análisis de varianza (ANOVA) se realizaron de acuerdo con Montgomery

(2008). Los análisis estadísticos se realizaron con los utilitarios R, 3.0.2 (R Core Team, 2013, Viena, Austria) y Statgraphics Centurion XV (versión 15.02.06, 2007, StatPoint Inc, Herndon, VA, Canadá), utilizando un valor crítico de p: 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los rendimientos de AIR fueron de 63 g / 100 g de CWM para tallo y 78 g / 100 g de CWM para brácteas.
El AIR de brácteas estaba constituido por 86,4 g de carbohidratos totales / 100 g (celulosa 22,2 g / 100 g; ácido galacturónico 8,7 g / 100 g; inulina 7,9 g / 100 g; otros carbohidratos no celulósicos 47,6 g / 100 g), 8,5 g de proteínas/ 100 g y 15,1 g de lignina / 100 g. El AIR de tallo contenía 81,3 g de carbohidratos totales / 100 g (celulosa 18,9 g / 100 g; ácido galacturónico 11,1 g / 100 g; inulina 11,9 g / 100 g; otros carbohidratos no celulósicos 39,4 g / 100 g), 9,0 g de proteínas/ 100 g, y 14,8 g de lignina/ 100 g.

Composición y rendimiento de las fracciones aisladas

Los AIR fueron tratados con enzimas (hemicelulasa y/o proteasa) a una temperatura de 40°C durante 5 h y a un pH de 5,2 (Voragen et al. 2001, Howard et al. 2003, Motamedzadegan et al. 2010, Wang et al. 2010, Denglin et al. 2011, Hassan et al. 2013).
Como se puede observar en las **Tablas 2** y **3**, en general, el contenido de proteína, inulina, y polifenoles y también los rendimientos fueron mayores para las fracciones obtenidas a partir de los tallos. El contenido de ácido galacturónico y, en algunos casos, el contenido total de carbohidratos fue más alto para las fracciones obtenidas a partir de brácteas.
Con respecto a las fracciones aisladas a partir de brácteas, puede observarse que:
a- El contenido de carbohidratos totales tiende a aumentar para algunos tratamientos, cuando la hemicelulasa está presente en concentraciones entre 100-200 mg.
b- El contenido de proteínas y polifenoles tiende a disminuir cuando la hemicelulasa o ambas enzimas están presentes.

Tabla 2. Composición de las fracciones aisladas de brácteas de *Cynara cardunculus.*

Sistema	**Tratamiento** (proteasa/ hemicelulasa)[1]	**Carbohidratos totales** (g/100g)[2]	**Proteínas** (g/100g)	**Ácido galacturónico** (g/100g)	**Inulina** (g/100g)	**Polifenoles** (g/100g GAE)[3]	**Rendimiento** (g/100gAIR)
1	(0/0)	75±1 a	3,5±0,1 fg	38,2±1,2 ab	12,3±0,1 b	9,4±0,3 de	3,8
2	(200/0)	75±1 a	3,8±0,2 g	38±3 ab	12,8±0,4 bc	9,6±0,7 e	4,6
3	(0/200)	02±8 d	2,7±0,1 cd	30±3 a	13±1 bcd	7,1±0,7 ab	4,2
4	(200/200)	93±3 cd	2,1±0,1 abc	42±3 b	14,7±0,2 d	6,8±0,2 ab	2,7
5	(170/100)	76±2 a	1,6±0,1a	35±2 ab	12,3±0,3 b	6,1±0,1 a	2,8
6	(30/100)	99±3 cd	2,6±0,4 cd	34±7 ab	14,3±0,1 cd	8,7±0,9 cde	4,4
7	(100/170)	82±1 ab	1,9±0,6 ab	34±7 ab	9,6±0,2 a	7,9±0,2 bcd	3,5
8	(100/30)	75,8±0,6 a	2,4±0,1 bcd	38±2 ab	12,7±0,1 bc	7,5±0,7 abc	7,8
9	(100/100)	96±5 cd	2,8±0,1 de	44±4 b	14±2 cd	8,2±0,6 bcde	4,4
10	(100/100)	90±1 bc	3,2±0,1 ef	34±4 ab	14,0±0,6 cd	9,3±0,5 de	3,7
11	(100/100)	76±1 a	2,5±0,2 cd	30±4 a	11,6±0,2 b	9,0±0,2 cde	2,9

[1] La concentración de proteasa se expresó en µL/5 g AIR. La concentración de hemicelulasa se expresó en mg/ 5g AIR.
[2] Calculado en relación a la curva de calibración con fructosa.

[3] GAE: equivalentes de ácido gálico.
Para los sistemas 1-11, dentro de cada columna, distintas letras minúsculas, indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Con respecto a las fracciones aisladas de tallo, puede observarse que:
a- El contenido de carbohidratos totales tiende a aumentar para algunos tratamientos, cuando la hemicelulasa está presente en concentraciones entre 100-200 mg.
b- Para las mayores concentraciones de enzimas (tratamientos 2,3 y 4) el contenido de polifenoles tiende a disminuir.
c- El rendimiento aumenta con la presencia de enzima.
La hemicelulasa (H) es un grupo de enzimas que degrada la pared celular que incluye xilanasas, manasas y arabinasas, las cuales pueden remover sustituyentes de hemicelulosa y, además, afectar uniones débiles de hemicelulosa-celulosa. La hemicelulasa utilizada en esta investigación tiene actividad residual de celulasa de acuerdo a los proveedores. La proteasa (P) puede degradar extensina, rica en hidroxiprolina y presente en la pared celular, lo que contribuye al debilitamiento de la pared celular. En consecuencia, las enzimas utilizadas pueden alterar de manera diversa la pared celular, determinando características diferentes en las fracciones obtenidas. Si bien la preparación de los AIR permitió la concentración de los carbohidratos y la eliminación de azúcares pequeños y otros componentes solubles en alcohol, es posible que se hayan perdido proteínas e inulina durante el tratamiento con etanol en el proceso de obtención del AIR, determinando las diferencias observadas.

Tabla 3. Composición de las fracciones aisladas de tallo de *Cynara cardunculus.*

Sistema	**Tratamiento** (proteasa/ hemicelulasa)[2]	**Carbohidratos Totales** (g/100g)[3]	**Proteínas** (g/100g)	**Ácido galacturónico** (g/100g)	**Inulina** (g/100g)	**Polifenoles** (g/100g GAE)[4]	**Rendimiento** (g/100g AIR)
1	(0/0)	73±3 ab	4,3±0,4 d	21,3±0,8 a	15±2 ab	11,7±0,4 d	5,1
2	(200/0)	74±4 abc	4,2±0,2 cd	19±1 a	26±3 e	8,6±0,3 ab	8,6
3	(0/200)	87,0±0,4 e	3,1±0,1a	18±2 a	11,4±0,1 a	8,1±0,3 ab	6,9
4	(200/200)	82±5 bcde	3,9±0,2 abcd	18±2 a	15±1 abc	7,2±0,4 a	7,0
5	(170/100)	77±1 abcde	4,1±0,1 bcd	17,7±0,5 a	15,1±0,2 abc	10,2±0,3 cd	7,4
6	(30/100)	84±6 cde	3,7±0,5 abcd	20±1 a	21±1 d	9,2±0,1 bc	7,6
7	(100/170)	85±6 de	3,9±0,1 abcd	14±3 a	14±2 ab	11±1 d	10,8
8	(100/30)	70±2 a	3,6±0,2 abc	18±2 a	19,2±0,2 cd	11±1 d	6,5
9	(100/100)	75,6±0,5 abcd	3,9±0,1abcd	21±1 a	15±5 abc	11±1 d	7,6
10	(100/100)	75±2 abcd	3,5±0,1 ab	20±2 a	15,6±0,5abc	12±1 d	6,0
11	(100/100)	79±2 abcde	4,1±0,1 bcd	38±12 b	17,1±0,6 bcd	15,1±0,4 e	6,6

[1] La concentración de proteasa se expresó en µL/5 g AIR. La concentración de hemicelulasa se expresó en mg/ 5g AIR.
[2] Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa.
[3] GAE: equivalentes de ácido gálico.
Para los sistemas 1-11, dentro de cada columna, distintas letras minúsculas, indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Análisis de regresión del diseño

Los resultados del análisis de regresión mostraron que para las fracciones aisladas a partir de brácteas, no se encontraron efectos significativos con las distintas concentraciones de proteasa y/o hemicelulasa en relación al contenido de ácido galacturónico, inulina, polifenoles totales ni con respecto al rendimiento. Para el contenido de carbohidratos se observó un efecto positivo pero poco significativo (p: 0,0314) de la hemicelulasa (H) con el modelo polinomial: $Y= 85,591 + 9,968 H$; además, el R^2 del modelo fue bajo (0,419). Para el contenido de proteínas, se observó un efecto negativo y ligeramente significativo con el uso de H (p: 0,0412), con un bajo R^2 (0,386) y el modelo polinomial $Y= 2,65- 0,5863 H$.
Para las fracciones aisladas de tallo, no se detectaron efectos significativos de las enzimas en los contenidos de proteínas y ácido galacturónico ni en el rendimiento. Para el contenido de carbohidratos se observó un efecto de H positivo y significativo ($p<0,001$; R^2: 0,722) con el modelo polinomial $Y= 78,2273 + 6,5622 H$. El contenido de inulina mostró un efecto negativo y poco significativo del uso de H con el modelo polinomial $Y= 16,6891- 3,5215H$ (p: 0,0382), con un bajo R^2 (0,396). Para el contenido de polifenoles, se observó un efecto negativo con el uso de proteasa (p: 0,0476 y R^2: 0,533) con el modelo polinomial $Y= 11,9468- 0,6693P-3,2018 P^2$.

CONCLUSIONES

El uso de un tratamiento enzimático (proteasa y/o hemicelulasa) a 40°C durante 5 horas, permitió obtener fracciones enriquecidas en fibra dietaria soluble a partir del residuo insoluble en alcohol de brácteas o tallo de alcaucil. La técnica es un método de extracción amigable con el medio ambiente que contribuye a mejorar la sustentabilidad del proceso de industrialización.
El rendimiento y la composición química de las fracciones fueron influenciadas por el tipo de tejido y los

niveles de hemicelulasa y proteasa. Las mayores concentraciones de enzima ensayadas fueron las más efectivas para incrementar el contenido de carbohidratos y el rendimiento. En general, la hemicelulasa mostró un efecto más marcado que la proteasa ejerciendo un efecto positivo en el contenido de carbohidratos de las fracciones.

BIBLIOGRAFÍA

Bunzel M, Ralph J, Marita J, Steinhart H. 2000. Identification of 4-O-5´-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 3166–3169.

Christaki E, Bonos E, Florou-Paneri P. 2012. Nutritional and functional properties of cynara crops (Globe Artichoke and Cardoon) and their potential applications: A Review. International Journal of Applied science and technology, 2:64-70.

Denglin L, Wei L, Jianxue L, Shengnan L. 2011. Acid-induced degradation behavior of inulin. In Proceedings of the International Conference on Agricultural and Biosystems Engineering, CA, USA, pág. 59-61.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Robers PA, Smith F.1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350 - 356.

FAO. 2014. Food wastage footprint: Impacts on natural resources : A summary report.

Filisetti-Cozzi TMCC, Carpita NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical Biochemistry, 197: 157–162.

Galanakis CM. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, Emerging technologies and commercialized applications. Trends in Food Science & Technology, 26:68-87.

Gallaher DD, Stallings WH, Blessing LL, Busta FF, Brady LJ. 1996. Probiotics, cecal microflora and aberrant crypts in the rat colon. Journal of Nutrition, 126: 1362-1371.

Goñi I, Hervert-Hernández D. 2011. By-products from plant foods are sources of dietary fiber and antioxidants.In Phytochemicals-Bioactivities and Impact on Health. Rasooli I. Ed. Rijeka, Croacia, pág.95-116.

Hassan MA, Haroun BM, Amara A A, Serour EA. 2013. Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from egyptian ecosystem. BioMed Research International. doi:10.1155/2013/175012

Heyer AG, Lloyd JR, Kossmann J. 1999. Production of modified polymeric carbohydrates. Current Opinion in Biotechnology, 10:169-174.

Howard RL, Abotsi E, van Rensburg ELJ, Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology, 2: 602–619.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265–275.

Martin-Cabrejas MAM, Waldron KW, Selvendran RR. 1994. Cell wall changes in spanish pear during ripening. Journal of Plant Physiology, 144: 541 - 548.

Maxwell EG, Belshaw N, Waldron KW, Morris VJ. 2012. Pectin-An emerging new bioactive food polysaccharide. Trends Food Science Technology, 24:64-73.

Montgomery DC. 2008. Design and analysis of experiments. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Motamedzadegan A, Davarniam B, Asadi G, Abedian A, Ovissipour M. 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna *Thunnus albacares* viscera using Neutrase. International Aquatic Research, 2: 173-181.

Ng A, Parr AJ, Ingham LM, Rigby NM, Waldron KM. 1998. Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* CV. Amstrong) during maturation and storage. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46: 2933 – 2939.

Orlovskaya TV, Luneva IL, Chelombit´ko VA. 2007. Chemical composition of *Cynara scolymus* leaves. Chemical of natural compounds, 43:239-240.

Quemener B, Thibault JF, Coussement P. 1993. Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. Lebensmittel Wissenschaft und

Technologie, 27: 125-132.
Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*.137, 830S-837S.
Ruiz-Cano D, Pérez-Llamas F, Frutos MJ, Arnao MB, Espinosa C, López-Jménez J, Castillo J, Zamora S.2014. Chemical and functional propreties of the different by-products of artichoke (cynara scolymus L.) from industrial canning processing. Food Chemistry, 160: 134-140.
Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungtic acid reagent. American Journal of Enology and Viticultire. 16: 144-158.
Slavin J. 2013. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. Nutrients, 5(4): 1417–1435.
Voragen F, Beldman G, Schols H. 2001. Chemistry and enzymology of pectins. In Advanced Dietary Fiber Technology. McCleary BV, Prosky L. Eds. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK, pág. 379-398.
Wang C, Wang Q, Tian J. 2010. Optimization of enzymatic production of oligopeptides from apricot almonds meal with neutrase and N120P. International Journal of Molecular Sciences, 11: 4952-4961.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Universidad de Buenos Aires UBACYT (089, 20020100100726 y 20020130100550BA); PIP (11220090100531 y 11220120100507); ANPCyT (PICT 2005-38239, 2012-1941, 2013-2088).

Caracterización de la maduración de quesos Gouda de elaboración regional mediante el seguimiento de la degradación proteica

Sousa M.F. [1], Ortiz Miranda G.S. [1], Mignino L.A. [1], Cantalupi A. [1]

(1) Área de Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP, Ruta 226 Km 73,5, Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Se investigó la maduración de un queso tipo Gouda de la cuenca lechera Mar y Sierras a través del seguimiento de la degradación proteica y otros parámetros asociados a este proceso. Los tiempos de maduración y muestreo de los quesos fueron: 0, 7, 14, 21 y 28 días. La caracterización se realizó mediante: contenido de humedad, pH, acidez total (AT) y soluble (AS), Índice de maduración (IM), proteína total (PT) y el avance de la degradación proteolítica mediante la cuantificación de nitrógeno soluble por precipitación fraccionada. La humedad disminuyó gradualmente hasta alcanzar valores estables al final de la maduración. Los valores de pH disminuyeron lentamente y a su vez los valores de AT y AS, fueron aumentando con el paso de los días de maduración. Se observaron cambios en las diferentes fracciones proteicas solubles, que fueron atribuidos al fenómeno de proteólisis. Se observó un aumento en el contenido de nitrógeno en todas las fracciones en el transcurso de los 28 días, evidenciando la proteólisis. El IM aumentó con el tiempo y resultó un buen predictor de la degradación proteolítica.

Palabras Clave: queso regional, maduración, proteólisis, valor agregado.

ABSTRACT

The maturation of a Gouda cheese from "Mar y Sierras" dairy basin has been investigated through monitoring of protein degradation and other parameters associated with this process. Ripening times and cheese sampling were: 0, 7, 14, 21 and 28 days. The characterization was done by: moisture content, pH, total acidity (AT) and soluble (AS), maturation index (IM), total protein (PT) and the progress of proteolytic degradation by quantifying soluble nitrogen by fractional precipitation. The humidity gradually decreased until reaching stable values at the end of ripening. The pH values decreased slowly and turn the values of AT and AS, were increasing with each passing day maturity. They were observed changes in the different fractions of soluble protein which were attributed to the phenomenon of proteolysis. It was observed an increase in the nitrogen content in all fractions during 28 days, demonstrating proteolysis. The IM increased with time and was a good predictor of proteolytic degradation

Keywords: regional cheese, ripening, proteolysis, added value.

INTRODUCCIÓN

Diversas regiones del mundo han desarrollado tipos de quesos que las caracterizan. Las variantes en el proceso de producción son tantas, que resulta imposible encontrar quesos que se elaboren de manera idéntica. Por esto, el queso regional puede ser considerado patrimonio cultural de la región, otorgándole valor agregado al productor. En relación al concepto de "valor agregado" es definido como la adición de valor económico que se incorpora a las materias primas o bienes intermedios en las diferentes etapas del proceso productivo hasta su conversión al consumo. Desde esta óptica, los actores de cada fase llevan a cabo sucesivas transformaciones físicas y/o intangibles (conocimiento tecnológico), que se inician en la faz de producción primaria, atravesando la industrialización, comercialización y la colocación final en el mercado

(Castellano y Goizueta, 2013). Por otro lado, la composición de la materia prima no sólo responde a cuestiones genéticas y a los ciclos vitales de la vaca, sino también a otras cuestiones como, por ejemplo, la alimentación del animal, influyendo por sobremanera en el tipo de queso producido. Por lo expuesto, la composición físico-química del queso está directamente relacionada con la de la leche de partida.

La maduración del queso es el proceso por el cual la cuajada, que tiene pobres características reológicas y sensoriales, se transforma en queso maduro, un producto muy preciado por sus buenas y diversas características de textura, aroma y sabor (Zalazar et al., 1986), además de otras modificaciones físico-químicas que darán a cada queso sus características propias (Guinee y Fox, 1987). Estas transformaciones se producen debido a que en la matriz del queso ocurren una serie muy compleja de reacciones bioquímicas que involucran la proteólisis, la lipólisis y el metabolismo de la lactosa residual, del citrato y del lactato, el metabolismo de los aminoácidos y de los ácidos grasos. Además de estas transformaciones enzimáticas, durante la maduración ocurren también procesos de naturaleza física, como la difusión de la sal y la evaporación del agua (Fox y McSweeney, 2004). La proteólisis es el evento bioquímico primario más importante que ocurre durante la maduración de los quesos, en muchas variedades (Grappin et al., 1985). Contribuye en la suavidad de la textura del queso durante la maduración, debido a la hidrólisis de la matriz caseínica de la cuajada y a través del decrecimiento de la actividad del agua (a_w) de la matriz, producido por cambios en el agua ligada por la formación de nuevos ácidos carboxílicos y grupos amino, formados por la hidrólisis. La actividad proteolítica, responsable de la coagulación de la leche y formación del queso, continúa durante la maduración, hidrolizando las caseínas y transformando la cuajada inicial en el queso maduro. Durante la maduración se produce la ruptura de proteínas, formando grandes y pequeños péptidos a partir de los cuales se forman péptidos más pequeños, aminoácidos y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. La proteólisis influye además en la composición química del queso: pH, concentración de sal y humedad (Farkye, 1992). Si bien existen numerosos trabajos relacionados con la maduración de quesos de pasta semidura, hasta el momento no existen antecedentes acerca de la maduración de este tipo de quesos elaborados a partir de leches de la Cuenca Mar y Sierras. El objetivo del presente trabajo es evaluar y caracterizar la maduración de quesos de pasta semidura de la cuenca lechera Mar y Sierras y, a través de la degradación de las proteínas y parámetros asociados, para otorgarles valor de origen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Maduración y muestreo

En el presente trabajo se estudiaron quesos de pasta semidura, tipo Gouda, provenientes de una empresa del rubro lácteo de la Cuenca Mar y Sierras. Los quesos, pertenecientes al mismo lote de elaboración, fueron madurados en la planta elaboradora en cámaras acondicionadas a 12°C y 80% de humedad relativa. Se tomaron muestras en distintas instancias de maduración: al finalizar el procesamiento (tiempo 0) y a los 7,14, 21 y 28 días de maduración. Durante este período se tomaron muestras, se envasaron individualmente en bolsas de polietileno al vacío y se trasladaron desde la fábrica hasta el Laboratorio de análisis. El muestreo de los quesos se realizó según norma FIL-IDF 50C:1995. Para cada tiempo de maduración se contó con dos hormas de quesos, a las que se realizaron las determinaciones correspondientes por triplicado.

Humedad

Se realizó por secado en estufa a 102°C, de acuerdo a la metodología de la Federación Internacional de Lechería (Norma 4°, FIL-IDF, 1982).

pH

Se determinó en un homogenato de queso y agua, en una relación 1:4 (P/V), mediante un pHmetro provisto con un electrodo combinado (vidrio y calomel).

Acidez total y soluble

Se determinaron por el método Dornic, empleando NaOH 0,1 N en presencia de una solución alcohólica de fenolftaleína al 2% (AFNOR, 1980). La acidez total se determinó en un homogenato de queso en agua, mientras que la acidez soluble se determinó en una solución filtrada de homogenato de acuerdo a los descrito

por Meyer *et al*. (1982).

Cuantificación de nitrógeno

Se realizó mediante el método de Micro-Kjeldahl y se utilizó el factor 6,38 para conversión a proteína, los valores se expresaron en base seca. El análisis se llevó a cabo siguiendo lineamientos de la Norma de la Federación Internacional de Lechería (Norma 20B, FIL-IDF, 1993).

La proteína total (PT) se cuantificó en la masa casearia a los diferentes tiempos de maduración, y fue fraccionada por medio de precipitación ácida. Para ello se realizaron homogenatos a los que se les ajustó el pH a 4,6 y se centrifugó, para cuantificar proteína soluble (PS). Las fracciones derivadas para PS fueron expuestas a distintos ácidos y se cuantificó: Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético 2% (TCA 2%), determinándose péptidos de peso molecular (PM) menor a 6.000 Da, Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético 12% (TCA12%), determinándose péptidos de PM menor a 2.000 Da y Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 5% (PTA), cuantificándose aminoácidos libres (Bernal et al. 1.993). Adicionalmente se calculó el índice de maduración (IM) como el porcentaje de PS sobre PT del queso (Laborda 2.000).

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y al test de Tukey, con una significancia del 5%, mediante el programa estadístico (InfoStat versión 2.014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Humedad

El agua es uno de los principales componentes de los quesos de pasta semidura, múltiples factores pueden afectar la proporción de este compuesto en el producto final. En la **Figura 1**, se muestra la evolución del contenido de humedad para los tiempos de maduración fijados en estos quesos, se puede observar una tendencia general a la disminución del contenido acuoso con el tiempo de maduración, exceptuando el día 28, en donde este parámetro se estabiliza (p>0,05) (Carrion Sad, 2015). Durante el proceso de maduración de los quesos se producen cambios físico-químicos en sus componentes mayoritarios, a lo largo de esta etapa el contenido acuoso tiende a disminuir gradualmente hasta alcanzar una composición relativamente constante cuando finaliza la maduración, siendo una de las transformaciones más importantes en el proceso estudiado (Prentice, 1987).

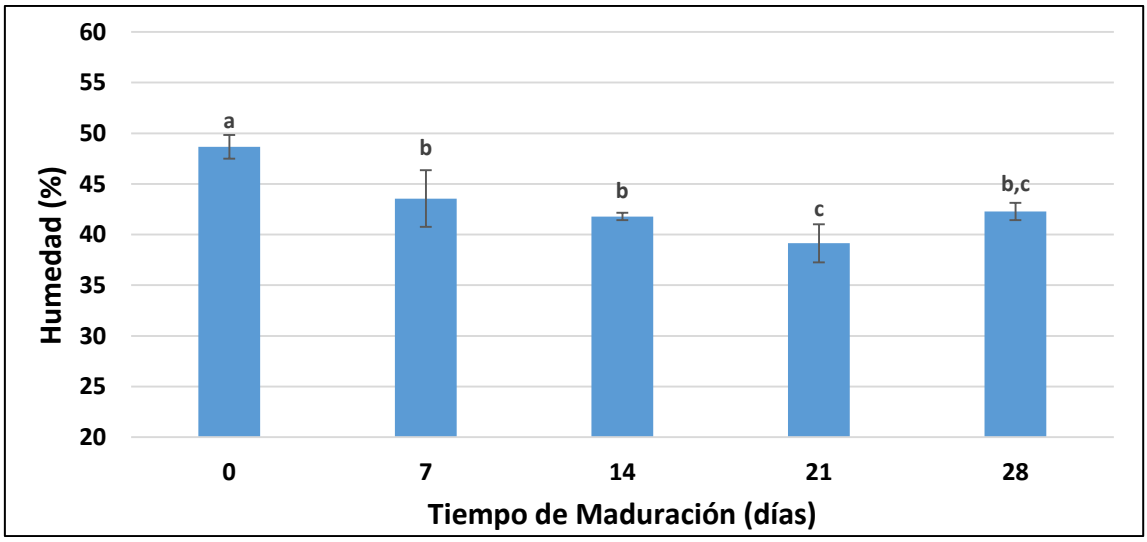


Figura 1. Valores de humedad del queso en función del tiempo de maduración. Se representan los valores

promedio ± DS (n=6). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0,05).

pH, Acidez soluble y Acidez total

El pH y la acidez son algunos de los parámetros físico-químicos más importantes de la leche ya que da una idea de su calidad higiénica y sanitaria, contribuyendo al sabor y textura. En la producción de quesos, estos parámetros se modifican a medida que avanza el grado de maduración. En las **Figuras 2** y **3** se muestran los valores obtenidos para los parámetros físico-químicos evaluados: pH, Acidez Total y Acidez soluble.

En la **figura 2**, se puede observar que el pH del queso disminuye significativamente hasta los 14 días de maduración (p<0,05), después de este período, los valores de este parámetro se estabilizan. Este comportamiento es el esperado, dado que en el proceso de maduración se producen modificaciones en la ecología microbiana del queso. A medida que avanza el tiempo comienzan a predominar bacterias del ácido láctico y bacterias propiónicas con la consecuente acumulación de ácidos orgánicos, productos de sus propios metabolismos (McSweeney, 2004). El pH del queso resulta de un balance de calcio y fosfato, de la lactosa residual y de la relación sal-humedad (Upreti y Metzger, 2007).

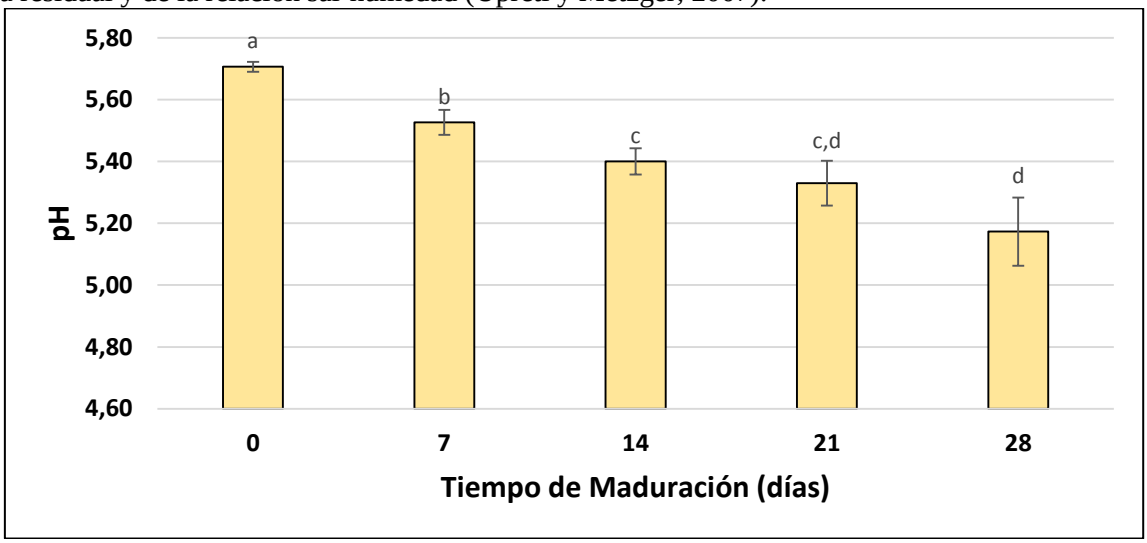


Figura 2. Valores de pH en función del tiempo de maduración. Se representan los valores promedio ± DS (n=6). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0,05).

La acidez es un parámetro que está determinado por múltiples factores, estos pueden ser microbianos o aquellos debidos a los distintos componentes de la leche. En la **Figura 3**, se observa un aumento significativo (p<0,05) de los valores acidez total y soluble, respectivamente, durante el transcurso de los días de maduración. Ambas determinaciones presentan un comportamiento similar. Como se mencionó en la determinación del pH, los cambios en estos valores se deben a la modificación en la ecología microbiana, por lo tanto, es de esperar que los valores de acidez se modifiquen a lo largo de la maduración (Upreti y Metzger, 2007). En la elaboración de queso Gouda se produce la acidificación por el agregado de bacterias lácticas, controlando la acidificación por medio del proceso de lavado de la masa, que reduce el contenido de lactosa remanente en la cuajada.

El valor de pH ideal al final de la elaboración es 5,2. A este pH, la caseína que originalmente tenía gran cantidad de calcio y fósforo se ha desmineralizado parcialmente (pasa de fosfocaseinato di-cálcico a fosfocaseinato mono-cálcico). Esta pérdida es necesaria, pues un pH de 5,2 en esta etapa del proceso permite obtener un excelente queso luego de la maduración, un queso semi-blando, flexible, elástico y brilloso (Dianda, 2008).

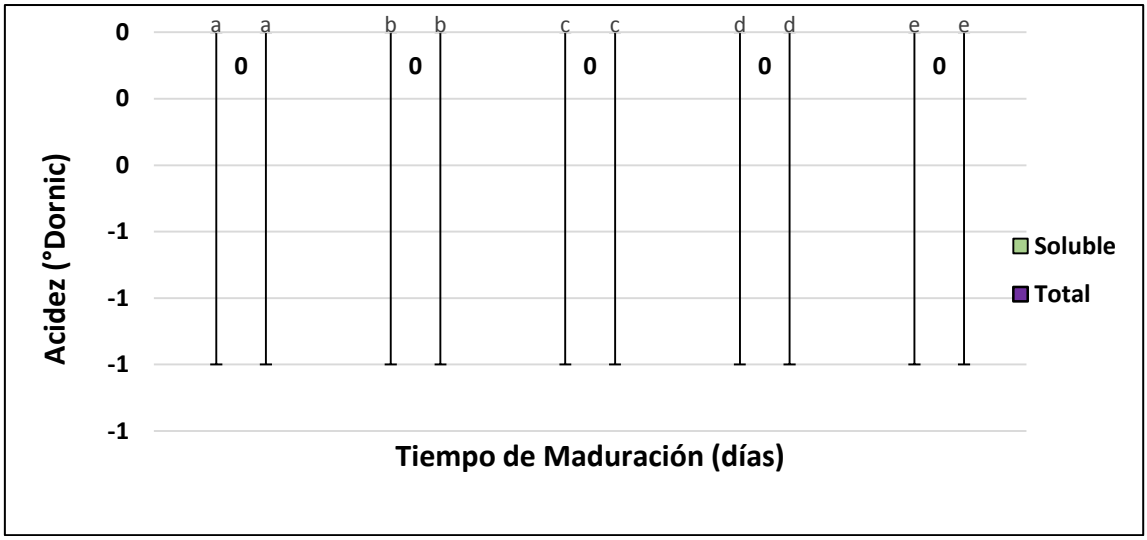


Figura 3. Valores de Acidez Soluble y Total en función del tiempo de maduración. Se representan los valores promedio ± DS (n=6). Diferentes letras minúsculas, entre barras de igual color indican diferencias significativas (p<0,05)

Proteína total, fracciones nitrogenadas e Índice de Maduración

La fracción proteica es uno de los principales constituyentes de los quesos, su composición química no es estática, sino que sufre modificaciones a lo largo de la maduración como consecuencia de la proteólisis. La actividad proteolítica, responsable de la coagulación de la leche y formación del queso, continúa durante la maduración, hidrolizando las caseínas y transformando la cuajada inicial en el queso maduro.

En la Figura 4 se pueden observar los porcentajes de proteínas totales expresados en función de la materia seca, estos valores tienden a mantenerse estables durante los 28 días de maduración. La diferencia significativa más contrastante se encontró con un valor máximo a los 28 días. Se debe considerar que el contenido proteico total no se modifica durante la maduración y que durante la proteólisis la proporción de los compuestos nitrogenados volátiles generados es despreciable. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que las diferencias encontradas pueden deberse a la toma de muestras heterogéneas de la masa del queso, dado que la técnica de análisis por Micro Kjeldahl requiere cantidades muy pequeñas de analito (~100 mg).

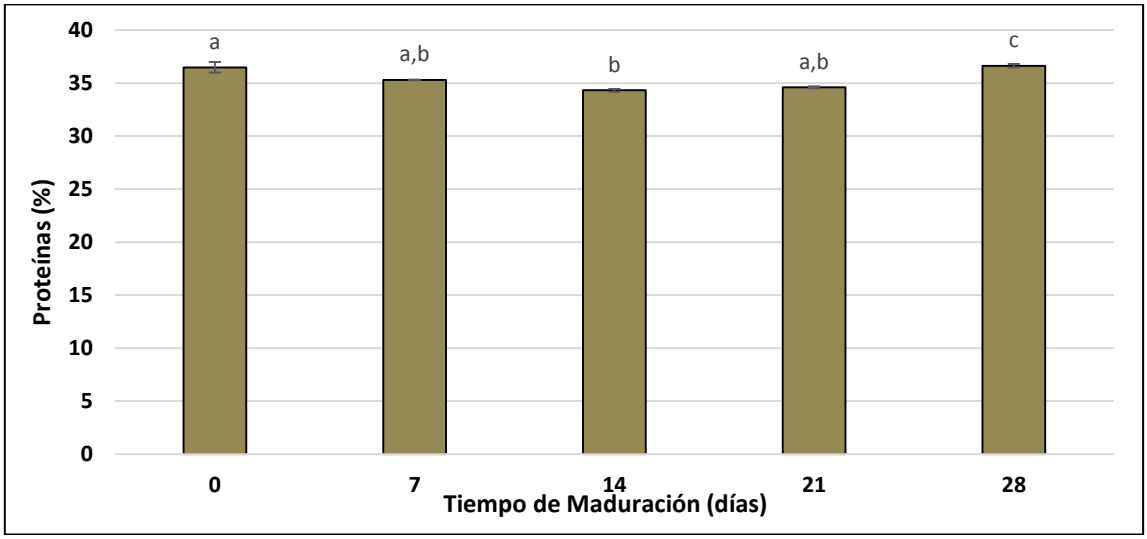


Figura 4. Proteína total de los quesos en función del tiempo de maduración. Se representan los valores promedio ± DS (n=6). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

A medida que avanza la maduración se generan péptidos de distinto peso molecular, como consecuencia de la acción de proteasas y peptidasas de distintos origenes. Las proteasas pueden ser de origen exógeno o endógeno, estas últimas pueden estar presentes en la leche o ser producidas por microorganismos propios de la leche.

La fracción soluble a pH 4,6, incluye proteínas (excluyendo las caseínas), todos los péptidos de hasta 30-35 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos tales como aminas, urea y amoníaco.

En la **figura 5** se muestran los porcentajes de las distintas fracciones nitrogenadas solubles. No se observaron cambios significativos ($p>0,05$) en la proteína soluble a pH 4,6 entre los 0 y los 14 días de maduración, el cambio comienza a ser evidente a los 21 días, donde se puede visualizar un aumento que se mantiene estable hasta los 28 días de maduración.

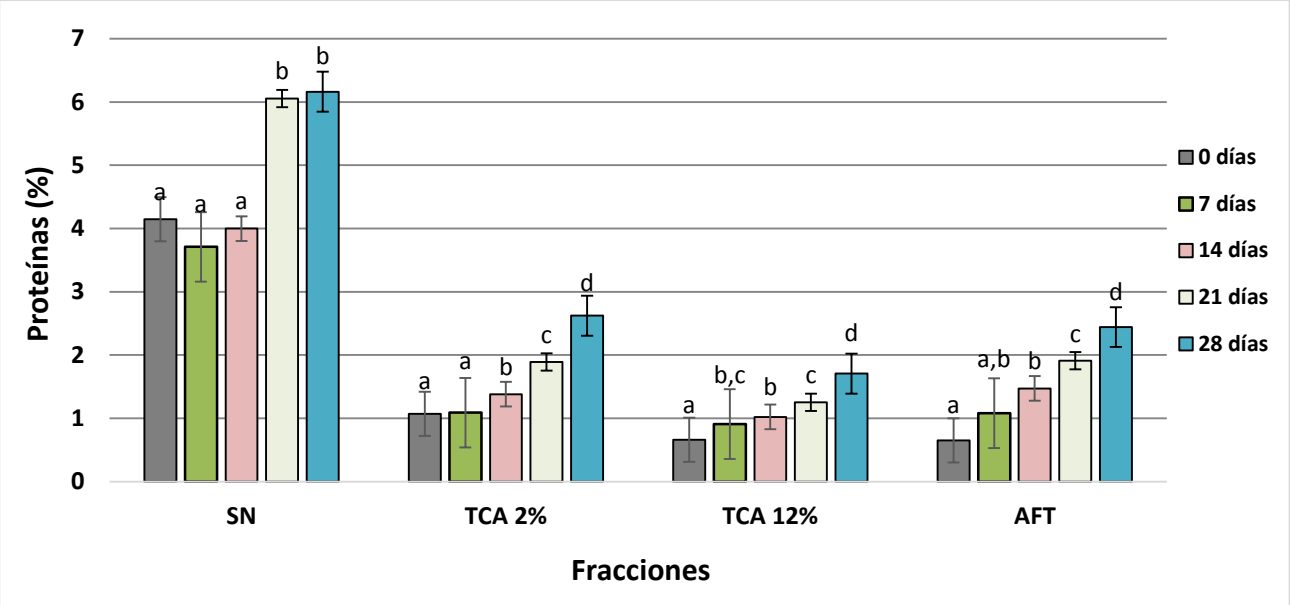


Figura 5. Evolución de las distintas fracciones nitrogenadas durante los 28 días de maduración. Se representan ± DS (n=6). Diferentes letras minúsculas, entre barras de igual color indican diferencias significativas (p<0,05)

En la **Figura 5**, se presenta además la evolución de las fracciones solubles en TCA 2%, TCA 12% y AFT. Como se puede observar, las fracciones que aumentan en forma gradual semanalmente son las solubles en TCA al 12% y las solubles en ácido fosfotúngstico. Por el contrario, este aumento no es progresivo en las fracciones soluble (SN) y la soluble en TCA al 2%, en las cuales se pueden observar mesetas donde no hay cambios significativos.

El ácido tricloroacético (TCA) es un precipitante de proteínas que ha sido ampliamente utilizado debido a que proporciona información de la extensión global de la proteólisis. La fracción soluble TCA al 2% está representada por péptidos con un número de residuos de aminoácidos de peso molecular menor a 6000 Daltons. En la **Figura 5** se visualiza la evolución de estos péptidos a lo largo de la maduración, los que presentan un claro aumento de esta fracción nitrogenada a partir de los 14 días. Para evaluar los péptidos de menor peso molecular que se generan por la proteólisis, se aumentó la concentración de ácido tricloroacético al 12%. En esta fracción están comprendidos aquellos péptidos cuyo número de residuos son menores a 2000 Da, se puede visualizar que a los 7 días se produce un aumento significativo en esta fracción. Yvon et al. (1989) hallaron que todos los péptidos con menos de siete residuos de aminoácidos eran solubles en TCA al 12%. La renina es responsable de la producción de parte del nitrógeno soluble en TCA 12%, pero las proteinasas y peptidasas del cultivo iniciador también contribuyen considerablemente a la formación del nitrógeno soluble en TCA 12%. En esta fracción están comprendidos aquellos péptidos cuyo número de residuos son menores a 2000 Da.

El ácido fosfotúngstico (AFT) es un precipitante de proteínas muy selectivo. El nitrógeno soluble en AFT ha sido ampliamente utilizado como índice de aminoácidos libres en queso, sólo aminoácidos libres y péptidos menores son solubles en AFT 5% (Sánchez-Ponte, 2003). La fracción de Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-AFT) contiene compuestos con un peso molecular hasta 600 daltons, que incluyen péptidos muy pequeños, aminoácidos y compuestos nitrogenados menores, excepto aminoácidos dibásicos (lisina, arginina y ornitina) y amoníaco (Ardö, 1999). Estos compuestos presentan un marcado aumento a los 7 días de maduración.

Las tres fracciones solubles en ácidos crecen a expensas de la proteína soluble reflejando así el grado de avance y la profundidad de la proteólisis. Entonces, se puede asegurar que las fracciones aumentaron durante

el periodo estudiado, lo cual era esperado debido a que son índices de proteólisis primaria y secundaria (Fox, 1993).

La proteólisis contribuye a la textura suave del queso durante la hidrólisis de la matriz caseínica, mientras decrece la actividad de agua (Fox y McSweeney, 1996). A su vez, tiene influencia directa en el sabor, debido a la producción de péptidos cortos y aminoácidos (Sousa et al. 2001). Los compuestos nitrogenados que contribuyen al sabor son solubles en solventes acuosos, por lo que se esperaría una mejora en el análisis sensorial del queso transcurridos los días de maduración. Los cientos de péptidos presentes en la muestra son fraccionados de acuerdo a su masa molecular, su hidrofobicidad y conformación en las distintas fracciones, siendo una técnica útil para comparar el grado de avance de la proteólisis entre muestras de quesos y en consecuencia como índice de maduración del queso.

Tabla 1. Índice de maduración (NS/NT) de los quesos a través de los días de maduración

IM (SN/NT)	0 días	7 días	14 días	21 días	28 días
Promedios	10,5 ± 0,3 a	11 ± 0,3 a	12 ± 0,15 b	17 ± 0,1 c	17 ± 0,2 c

Los cambios que se producen en la estructura y textura del queso durante la maduración, están asociados a la degradación proteolítica de la masa casearia. Las fracciones nitrogenadas de bajo peso molecular se relacionan con atributos sensoriales deseados en el producto terminado. Como se mencionó previamente, la degradación proteolítica afecta la estructura de la matriz proteica del queso, durante este proceso se generan componentes de bajo peso molecular que contribuyen a las propiedades sensoriales de los quesos al finalizar la maduración (Gunasekaran y Ak, 2003).

En la **Tabla 1**, se observa un aumento significativo ($p<0,05$) del índice de maduración a partir de los 14 días, manteniéndose estable al finalizar la misma. Este análisis complementa los anteriores resultados. La determinación del índice de maduración podría utilizarse como parte de un modelo predictorio de maduración (Laborda, 2000).

CONCLUSIONES

La PT se mantuvo entre 34% y 38% hasta el final de la maduración. Se observaron cambios en las diferentes fracciones proteicas, atribuidos al fenómeno de proteólisis. Se observó un aumento en el contenido de nitrógeno en todas las fracciones (PS, TCA2%, TCA12% y PTA) en el transcurso de los 28 días.

El IM aumentó con el tiempo y resultó un buen predictor de la degradación proteolítica. Esta proteólisis podría afectar la estructura de la matriz proteica del queso; las modificaciones en los parámetros analizados suponen variaciones en las propiedades sensoriales del mismo al finalizar la maduración, otorgándole caracteres distintivos al queso.

BIBLIOGRAFÍA

AFNOR Association française de Normalisation. 1980. Laits et produits latiers: methodes d' analyse. Paris. Vol I. pp. 345-359.

Ardö Y. 1999. Chemical methods for evaluating proteólisis in cheese maturation. International Dairy Federation, Bruselas, Belgica. Bulletin IDF 337. pp. 4-9.

Bernal SM, Palma S, Hynes ER, Perotti MC. 1993. Determinación de fracciones nitrogenadas para el seguimiento de la maduración de quesos. Rev. Arg. Lactología. 6 (2):10-18.

Carrion Sad Y. Caracterización de la maduración de queso Gouda de elaboración Regional y proveniente de leche funcional a través del seguimiento de la lipólisis. Tesis de grado. 47 pp. UNMDP

Castellano A, Goizueta ME. 2013. Patrones de innovación y alternativas de agregado de valor en la Industria Láctea Argentina. INTA, Estación Experimental Regional Agropecuaria Balcarce, Argentina. Informe técnico N°12. 2p.

Dianda MA. 2008. Elaboración de quesos artesanales. Hemisferio Sur S.A., Montevideo, Uruguay. 23p.
Guinee TP, Fox PF. 1987. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological aspects. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology Vol. I. Londres, Inglaterra. pp. 45-16.
Grappin R, Rank TC, Olson NF. 1985. Primary proteolysis of cheese during ripening. J. Dairy Sci. (68): 531-540.
Gunasekaran S, AK MM. 2003. Cheese rheology and texture. Trends Food Sci. Tech. (11): 115-127.
Farkye NY. 1992. Contribution of milk-clotting enzymes and plasmin to cheese ripening. Chemestry of Structure-Function Relationship in Cheese. pp. 195-207.
FIL-IDF. 1982. Determinazione della materia secca. Metodo di referimento. N°4ª. Internacional Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. pp. 184-188.
FIL-IDF. 1993. Determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento. N°20B. Internacional Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. pp. 74-107.
FIL-IDF. 1995. Lait et produits laitiers. Guide de L' Echantillonnage. Metodo di riferimiento. N° 50C. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. pp. 11-19.
Fox PF. 1993. Cheese: Chemestry, Physics and Microbiology. Vol. I. 2nd Edition: Chapman & Hall. Londres, Inglaterra. 65p.
Fox PF, McSweeney PLH. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. Food Revist. (12): 457-509.
Fox PF, McSweeney PLH. 2004. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol, 1: General Aspects; Cap. 9: Cheese: Methods of Chemical Analysis (Eds): Fox, P. F., McSweeney, P., Cogan, T., Guinee, T. Academic Press, Estados Unidos. pp. 341-381
INFOSTAT Versión. 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [En línea] <www.infostat.com.ar> [Consulta: Agosto, 2015]
McSweenwy PHL. 2004. Biochemistry of cheese ripening. Department of Food and Nutritional Sciences, University College, Cork, Ireland. Int. J. Dairy Technol. (57): 137.
Meyer RM, Gaetano P, Usami OC, Medina FJ. 1982. Control de calidad de productos agropecuarios. Manuales para educación. Editorial Trillas, S.A. Distrito Federal, México. 59p.
Mustar A. 2013. Propiedades reológicas del queso tipo Cuartirolo: Efecto de variables del proceso en planta piloto. Tesis de grado. Facultad de Ingenieria. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. pp. 104-107.
Laborda MA. 2000. Maduración de quesos con bajo contenido de cloruro de sodio. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. pp. 56-107.
Prentice JH. 1987. Cheese Rheology. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology. (Edits.): Fox, PF. Elsevier Applied Science, Londres, Inglaterra. Vol. I: 87p.
Sanchez-Ponte MD. 2003. Maduración acelerada de queso con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. Rev. Científica Arg. 13 (4): 299-306.
Sousa MJ, Ardö Y, McSweeney, PLH. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. Int. Dairy J. (11): 327-345.
Upreti L, Metzger LE. 2007. Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt to moisture ratio on Cheddar cheese quality: pH changes during ripening. J. Dairy Sci. (90): 1-12.
Yvon M, Chabanet C, Pélissier JP. 1989. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. Int. J. Peptide Protein Res. (34): 166-176.
Zalazar CA, Meinardi CA, Bernal SM, Candioti M. 1986. Características de los quesos Argentinos tipo Patregrás. Rev. Lactología. Santa Fe, Argentina. 8p

Aceptabilidad y calidad sensorial de pan libre de gluten elaborado con adición de harina de algarroba negra (*Prosopis nigra*)

Torrelio Martos, A. G. [1], Margalef, M. I. [1,2], López, E. P. [2, 3].

(1) Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta – Argentina.
(2) Instituto de Investigación Sensorial de Alimentos, Universidad Nacional de Salta – Argentina.
(3) CONICET – Universidad Nacional de Jujuy – Argentina.
estelapatricialopez@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue caracterizar sensorialmente panes libres de gluten elaborados con adición de harina de algarroba negra (*Prosopis nigra*). Se formularon cuatro productos incluyendo harinas de maíz, arroz y algarroba negra, y adición de concentrado de proteínas de suero lácteo (CPSL) y/o goma xántica (GX). Respecto a la aceptabilidad general los cuatro panes fueron calificados sobre los 5 puntos ("*me gusta"*), siendo el pan GX el de mejor puntaje hedónico (6,00±1,59) según las personas no celiacas, y el CPSL+GX para las personas con la afección (6,18±1,16). No se detectaron diferencias al comparar los puntajes para los panes por consumidores celíacos y no celíacos ($p<0,05$). Las muestras con mejor puntuación hedónica para textura fueron las elaboradas con agregado del hidrocoloide (GX y CPSL+GX), obteniendo ambos productos puntajes similares según celíacos y no celiacos. Respecto a la aceptabilidad para sabor, las muestras presentaron sabor aceptable (de 4,47±1,96 a 6,17±1,42) tanto para celíacos como para los consumidores sin esta condición. La intención de consumo fue del 90% para el pan con GX según los consumidores celíacos y la muestra con CPSL+GX resultó la más elegida por los no celíacos (96%). La mayor intención de compra fue para la formulación con GX (80%) según los participantes celíacos y el pan con CPSL+GX alcanzó el 89% para los no afectados por la patología. El pan GX logró una puntuación de calidad de 94,13±1,54 ($p<0,05$) y la formulación CPSL+GX de 95,94±3,23, resultando significativamente mayor ($p<0,05$) a las muestras sin hidrocoloide. En conclusión, los panes formulados resultaron aceptables para los consumidores celíacos y no celíacos, con altos porcentajes de intención de consumo y compra, mientras que los evaluadores apreciaron que la muestra CPSL+GX logró características más similares a las del pan de trigo.

Palabras clave: algarroba negra, pan, celiaquía, aceptabilidad, calidad sensorial.

ABSTRACT

The aim of this study was the sensory characterization of gluten-free breads made with *Prosopis nigra* flour. Four breads were formulated with a mix of corn, rice and *Prosopis nigra* flours, and the addition of concentrated whey protein (CPSL) and / or xanthan gum (GX). Regarding overall acceptability, the four loaves were rated above 5 points ("like"). The bread named GX, had the best hedonic score (6.00 ± 1.59) for celiac patients, and the sample CPSL + GX, for people without the condition (6.18 ± 1.16). No differences were detected in acceptability when samples were compared between celiac and non- celiac persons. The best hedonic scores for texture were for the samples with addition of hydrocolloid (GX and GX + CPSL). Regarding acceptability to taste, all the samples showed acceptable taste (4.47 ± 1.96 to 6.17 ± 1.42) and significant differences were not found. the most purchase intent was for the GX formulation (80%) for celiac participants, and bread with CPSL + GX reached 89% for those not affected by the disease. Respect to de quality punctuation, the bread GX achieved a score of 94.13 ± 1.54 ($p<0.05$) and the CPSL + GX formulation of 95.94 ± 3.23, resulting significantly higher ($p<0.05$) than the samples without hydrocolloid. In conclusion, the breads made with addition of *Proopis nigra* flour were acceptable for celiac and non-celiac consumers, with high percentages of consumption and purchase intentions. But, in opinion of

the participants, the CPSL + GX sample achieved more similar characteristics to those of wheat bread.

Keywords: *Prosopis nigra*, bread, celiac disease, acceptability, sensory quality.

INTRODUCCIÓN

Al eliminar el gluten en la elaboración de panificados aparece un inconveniente tecnológico (Mohammadi y col., 2014) ya que el empleo de harinas, féculas y/o almidones sin TACC para la obtención de panes, limita la calidad sensorial de estos productos (Lazaridou y col., 2007). Habitualmente se utilizan harinas y almidones de maíz, arroz, mandioca y legumbres, pero constantemente se buscan nuevas opciones para mejorar sensorial, tecnológica y nutricionalmente los productos sin TACC, lo cual contribuiría a la diversificación de la dieta del celíaco. Una de estas nuevas alternativas es la harina de algarroba negra (*Prosopis nigra*) (HAN), ya que se trata de un producto noble, que además de no contener prolaminas tóxicas, es rica en proteínas, fibra y minerales (Trevisson, 1992; Gonzalez Galán y col., 2008), contribuyendo al tratamiento dietético integral de la enfermedad celíaca. Pero además de ser una opción nutritiva muy valiosa, la HAN constituye un ingrediente no tradicional de producción regional, con atributos sensoriales distintivos que posibilitarían la formulación de productos innovadores y aceptables por el consumidor, dado que otorga a las preparaciones un sabor y color característico, similar al chocolate (Margalef, y col., 2012).

Por otra parte, incluirla en la formulación de un producto tan ampliamente consumido como el pan, contribuiría como estrategia para incrementar el valor agregado de este recurso natural propio del Noroeste y Noreste Argentino.

Dado el inconveniente tecnológico que significa la ausencia del gluten en panificación, la industria alimentaria busca reemplazar la funcionalidad de esta red proteica haciendo uso de una cada vez más amplia variedad de ingredientes alimentarios con características funcionales que mejoren la calidad física de los panificados sin TACC (Matos Segura, 2013), entre ellos la goma xántica (GX) y el concentrado de proteínas de suero de leche (CPSL). Ambos favorecen la formación de una estructura que contiene los gases generados durante la fermentación y el horneado, simulando las funciones del gluten (Kittisuban y col., 2014; Nunes y col., 2014; Sciarini y col., 2012; Lazaridou y col., 2007).

Adicionalmente, el agregado de CPSL podría contribuir a mejorar la cantidad y calidad de las proteínas aportadas por el producto, colaborando así a la recuperación y/o mantenimiento del estado nutricional de la persona celíaca.

De lo antes dicho surge la motivación del presente trabajo, cuyo objetivo fue caracterizar sensorialmente panes libres de gluten elaborados con adición de harina de algarroba negra (*Prosopis nigra*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la formulación de los panes sin TACC se trabajo con una mezcla de tres harinas comerciales libres de gluten: harina de algarroba negra (HAN), harina de maíz (HM) y harina de arroz (HA), todas marca YIN YANG (Dietética Científica, Buenos Aires, Argentina), cuyas composiciones centesimales se resumen en la **Tabla 1**. La proporción utilizada fue de HA:HM:HAN – 43:55:2.

Tabla 1. Composición química de harinas sin TACC a utilizar en este estudio.

Producto	Energía Kcal/100g	Carbohidratos g/100g	Proteínas g/100g	Grasas g/100g	Fibra g/100g
HAN	160	62,63	12,83	4,81	16,54
HA	170	39,00	3,30	-	-
HM	365	76,20	9,30	3,70	9,60

Fuente: Etiquetado nutricional de productos comerciales marca YIN YANG y Margalef y col., 2012. HAN: harina de algarroba negra; HA: harina de arroz; HM: harina de maíz

Además, para la formulación se emplearon los ingredientes sin TACC que se listan a continuación:
Aceite: de girasol alto oleico marca Cañuelas (Molinos Cañuelas, Cañuelas, Buenos Aires, Argentina).
Leche: entera fluida Sancor (Sancor, Sunchales, Santa Fe, Argentina).
Huevo: se incorporó huevo fresco entero.
Azúcar: común tipo A marca Rio Grande (Ing. Rio Grande, La Mendieta, Jujuy, Argentina)
Sal: de mesa marca Celusal (I.Q. y TIMBO S.A., Buenos Aires).
Levadura: tipo instantánea en polvo Levex (Lesaffre, Argentina S.A.).
La goma xántica (GX) de grado alimentario, marca Fufeng (Group Company Limited, China) fue adquirida en el mercado local.
El concentrado de proteínas de suero de leche (CPSL) (Marca Milkaut, Argentina) fue donado para este trabajo por la empresa COSALTA S.A.

Método de elaboración de los panes sin TACC, control y adicionados.

El producto se elaboró en máquina para pan, marca Moulinex. Los ingredientes fueron mezclados en la máquina durante 15 minutos, posteriormente se dejaron levar durante 30 minutos, con un leve incremento de la temperatura del horno para proceder a un segundo amasado o desgasificación. Luego se realizó el segundo levado. Al finalizar esta hora treinta de procedimiento, la masa de consistencia semilíquida se trasvasó a un molde de silicona tipo budín inglés, apto para horno. Allí se realizó la tercera fermentación durante 30 minutos a 26°C – 28°C. Posteriormente se procedió a la cocción en horno eléctrico (Ariston) a 160°C, durante 30 minutos. El procedimiento totalizó 2:30 hs, obteniendo un producto final de 430±10 g, al que se denominó pan Control.
A la misma formulación de pan control se le adicionó goma xántica (GX) y/o concentrado de proteínas de suero lácteo (CPSL) al 2% p/p en base premezcla, obteniéndose los panes que se detallan en la **Tabla 2**. Los panes con adición de CPSL y/o GX requirieron mayor cantidad de leche para la formación de la masa, dado que sin esto, la mezcla resultaba excesivamente pesada. El proceso de elaboración y cocción fue idéntico al antes descripto para el Control.

Tabla 2. Denominación de los productos panificados obtenidos y variación en cantidad de leche necesaria para la formación de las masas.

DENOMINACIÓN	Goma xántica	CPSL	Adición de leche (ml)
Control	no	No	175
CPSL	no	2%p/p	200
GX	2%p/p	No	200
CPSL+GX	2%p/p	2%p/p	220

CPSL: concentrado proteico de proteínas de suero lácteo. GX: goma xántica
.

Aceptabilidad general y por atributos de los panes sin TACC

La aceptabilidad general y por atributos (textura, sabor y color) se midió en un total de 55 consumidores, de los cuales 27 fueron personas con diagnóstico de enfermedad celíaca al momento del estudio y 28 fueron no celíacos. Del total de participantes, el 67% fueron de sexo femenino, predominando aquellas personas con edades comprendidas entre 31 a 40 años.
Para determinar el puntaje hedónidco general y para cada uno de los atributos, se trabajó con una escala hedónica de siete puntos, donde 1= “me disgusta mucho” y 7= “me gusta mucho”.

Intención de compra y de consumo

La intención de compra y de consumo se determinó mediante encuesta, haciendo uso del mismo formulario

de evaluación hedónica, a cada uno de los participantes (n=55). Cada consumidor optó por una de las siguientes posibilidades para cada uno de los panes desarrollados: si consumiría - no consumiría - si compraría - no compraría.
Independientemente de cuál fuera su respuesta, se les solicitó también las razones de su elección.

Calidad sensorial

La calidad sensorial para cada pan sin TACC formulado se determinó con panel semi-entrenado de ocho integrantes. A cada miembro del panel se le entregó un formulario de evaluación donde se listaron los atributos a evaluar: apariencia, textura, sabor, aroma y color. A continuación se consensuaron los puntajes para cada atributo y para los descriptores establecidos dentro de apariencia y textura, según se detalla en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Valores consensuados para cada atributo de calidad sensorial en panes sin TACC.

			Puntaje consensuado
ATRIBUTO	**APARIENCIA**		**25**
	Descriptores	Forma de la rodaja,	10
		Homogeneidad de la miga	10
		Color de la miga	5
	SABOR		**30**
	AROMA		**10**
	TEXTURA		**35**
	Descriptores	Dureza de la miga	15
		Elasticidad de la miga	10
		Friabilidad (desmoronamiento)	10
		TOTAL	**100**

Cada panelista evaluó las cuatro muestras por duplicado. En todos los casos, los cuatro panes (una rodaja de cada uno) se presentaron a cada evaluador en una bandeja, dispuestos en recipientes individuales y codificados aleatoriamente.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron en valores medios con sus respectivos desvíos estándar. Para detectar diferencias significativas entre las medias de dichas variables se aplicó test de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. La comparación entre los múltiples valores medios se realizó aplicando prueba de Tukey HSD, tomando como nivel de significación $p<0,05$.

Las variables cualitativas o categóricas (intención de compra y de consumo) se expresaron como valores porcentuales.

También se calcularon coeficientes de correlación de Pearson entre todas las variables estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aceptabilidad general y por atributos

La **Tabla 4** resume los resultados obtenidos para la aceptabilidad de los productos panificados sin TACC, tanto para consumidores celíacos como aquellos sin esta condición.

Tabla 4. Aceptabilidad general y por atributos de panes sin TACC elaborados con harina de algarroba negra y adición de CPSL y/o GX.

	CONTROL		**CPSL**		**GX**		**CPSL+GX**	
	C/EC	**S/EC**	**C/EC**	**S/EC**	**C/EC**	**S/EC**	**C/EC**	**S/EC**
A. GRAL	5,07± 1,71a	5,11± 1,85a	5,10± 2,13a	5,61± 1,45a	6,00± 1,59a	5,25± 1,86a	5,70± 1,81a	6,18± 1,16a
TEXTURA	5,15± 1,85a	4,82± 1,81a	5,28± 1,93a	5,43± 1,60ab	6,17± 1,62b	5,43± 1,57a	5,89± 2,00ab	6,04± 1,14b
SABOR	5,32± 1,63a	4,75± 1,96a	5,61± 1,97a	5,57± 1,60a	6,17± 1,42a	5,12± 1,81a	5,89± 1,71a	5,96± 1,20a
COLOR	4,85± 1,74a	4,86± 1,41a	4,89± 2,17a	4,86± 1,33a	5,56± 1,76ab	5,32± 1,42ab	6,11± 1,24b	5,79± 1,26 ab

Valor medio ± D.E. C/EC: participante celíaco (*n=27*); – S/EC: participante no celíaco (*n=28*). Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p<0,05$). A. GRAL: Aceptabilidad general.

CPSL: Pan con concentrado de proteínas de suero lácteo; GX: Pan con goma xántica.

La aceptabilidad general para las diferentes formulaciones no presentó diferencias significativas ($p<0,05$). Los cuatro panes elaborados fueron calificados por encima de los 5 puntos (*me gusta*), siendo el pan con GX al que se le atribuyó mejor puntaje hedónico (6,00±1,59) por parte de las personas no celiacas, y la muestra CPSL+GX para las personas con la afección (6,18±1,16). Debe destacarse que no se detectaron diferencias al comparar los puntajes registrados para los panes por consumidores celíacos y no celíacos ($p<0,05$), lo cual significa que los productos gustaron por igual en ambos grupos poblacionales. Este es un dato muy relevante, dado que se esperaba que los consumidores no celíacos atribuyan puntajes menores, ya que quizás para ellos las muestras no presentaban las características esperadas para un pan. A su vez, los participantes celíacos, dieron muy buenas puntuaciones a los productos, lo cual adquiere relevancia si se considera que se trata de un grupo poblacional muy exigente, dado que en general, los panes sin TACC se consideran de baja calidad tecnológica (Gallagher y col., 2004).

Es de destacar que otros autores consideran que las formulaciones libres de gluten que alcanzan puntajes hedónicos iguales o mayores a 5 (medidas en escalas de 9 puntos), deben ser consideradas muy aceptables (Kittisuban y col., 2014; Lazaridou y col., 2014). Esto confirma que los panes con harina de algarroba negra, tanto patrones como adicionados, lograron excelentes puntuaciones. Respecto a lo comunicado en otras investigaciones, Kittisuban y col. (2014), hallaron que los panes elaborados con almidón de arroz, β-glucanos de levadura, HPMC y concentrado de proteínas de suero lácteo, presentaron una aceptabilidad general de 5,73±1,26 sobre escala hedónica de 9 puntos; mientras que Lazaridou y col. (2014), observaron que los panificados de harina de arroz, almidón de maíz y caseinato sódico presentaron un puntaje de 6,48 sobre escala de 9 puntos, incrementándose a 7 al adicionar 2% de GX y disminuyendo a 6,24 al agregar 1% del mismo hidrocoloide.

Los panes patrón resultaron con los menores puntajes hedónicos para textura (entre 4,82 y 5,15) ($p<0,05$), destacando que la variable celiaco - no celiaco no introdujo diferencias significativas. Mientras que, las muestras con mejor puntuación hedónica para el atributo textura fueron las elaboradas con agregado del hidrocoloide (GX y CPSL+GX), obteniendo ambos productos puntajes similares por parte de celíacos y no celiacos. Kittisuban y col. (2014) reportaron puntajes equivalentes para el atributo textura de panes de almidón de arroz, con adición de CPSL, HPMC y β-glucanos (7,43±0,62, en base una escala de 9 puntos).

Los valores promedio para el atributo textura se correlacionaron positivamente con la aceptabilidad general ($r=0,85$; ***$p<0,001$).

La aceptabilidad para el atributo sabor (**Tabla 4**) resultó sin diferencias significativas tanto para la variable tipo de pan, como la de consumidores. Esto se interpretó como que las muestras estudiadas presentaron sabor aceptable (de 4,47±1,96 a 6,17±1,42) tanto para celíacos como para los consumidores sin esta condición. Kittisuban y col. (2014), hallaron un puntaje de aceptabilidad para sabor de 5,27±1,08 para pan sin TACC con agregado de CPSL, mientras que Rodriguez Furlán y col. (2015), reportaron que la adición de plasma bovino, fibras y diferentes sacáridos no afectaron la puntuación hedónica para el sabor de panes libres de gluten de harina de arroz.

El valor promedio de color (**Tabla 4**) resultó mayor ($p<0,05$) para el pan con CPSL+GX, particularmente para los consumidores celíacos (6,11±1,24). Este resultado podría explicarse en que visualmente, el color resultó más agradable para los panes más aireados (dato no mostrado), ya que en los panes control, la muestra pudo parecer más oscura por la estructura densa y apelmazada de la miga.

Intención de compra y de consumo

Los resultados de la intención de consumo se muestran en la **Figura 1**. En relación a la intención de consumo, se detectaron diferencias en las opiniones vertidas por celíacos y no celíacos. Para el primer grupo (**Figura 1, A**), las muestras con mayor intención de consumo fueron: la control (81%) y aquella adicionada con GX (90%). Las principales razones de esta elección fueron que el pan control resultó delicioso/rico y saludable, y el pan con goma además de rico, fue húmedo y suave. Mientras que para los consumidores no celíacos (**Figura 1, B**), la mayor intención de consumo se registró para los panes con CPSL (86%) y

CPSL+GX (96%). El pan con concentrado proteico fue calificado como blando, suave y de agradable sabor. La muestra con CPSL+GX resultó sabrosa/agradable, saludable y de textura blanda.
Es de destacar que las principales razones de no consumo para el pan control fueron: miga pastosa, seca y poco sabor; para las muestras CPSL y GX la razón más importantes fue el no agrado del sabor.
Los consumidores que no consumirían el pan que combinó CPSL+GX dijeron que les resultó pesado. Las razones de consumo/no consumo fueron muy similares para ambos grupos poblacionales.

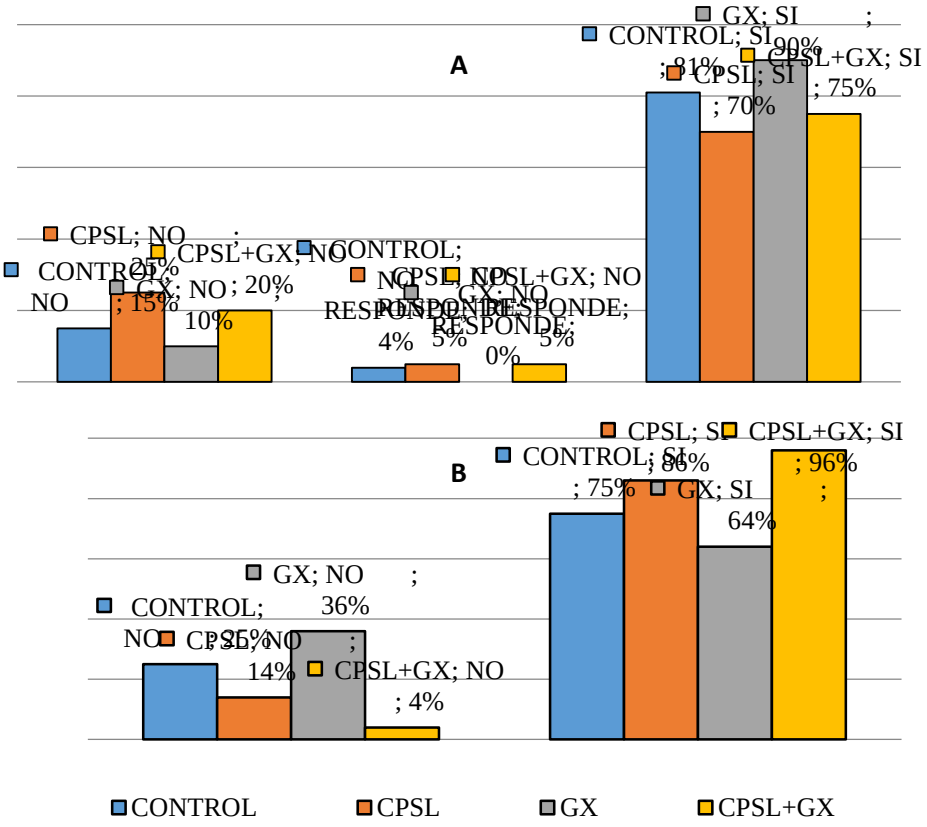


Figura 1. Intención de consumo medida por consumidores celíacos (A) y no celiacos (B), para panes sin TACC elaborados con harina de algarroba negra y adición de CPSL y/o GX.
A: (*n*=27); B: (*n*=28). NO: no consumiría. SI: si consumiría.

Las mayores diferencias en las opiniones se presentaron en las razones de compra, por lo cual a continuación, la **Figura 2** resume lo observado al analizar la intención de compra de los panes formulados.
Para el grupo de celiacos participantes, los panes control y con GX fueron los que lograron la mayor intención de compra (78% y 80% respectivamente). Las principales razones de esta elección fueron que el pan control resultó agradable, novedoso y saludable, mientras que el pan con goma se calificó como liviano, húmedo, saludable, necesario y similar al pan común (de trigo). Debe señalarse que todos los panes lograron una intención de compra igual o mayor al 70% para el grupo de consumidores celíacos, manifestando que comprarían los panes con algarroba negra por ser saludables, necesarios y/o novedosos.
El pan con CPSL registró el mayor porcentaje de intención de compra negativa (25%), en consumidores celíacos, quienes argumentaron que resultó no agradable en sabor.
Para las personas sin la afección, la mayor intención de compra fue para los panes con CPSL+GX y CPSL (89% y 79% respectivamente), dado que los primeros resultaron sabrosos/deliciosos, de buena textura y

similares al pan común, y los adicionados con concentrado proteico fueron calificados como ricos/agradables.
La mayor intención de compra negativa fue para la muestra con hidrocoloide (39%), argumentando la no elección por la falta de sabor/falta de sal.
En resumen, se detectaron diferencias en los puntajes de aceptabilidad por atributo (textura y color) a favor de las dos muestras con hidrocoloide (GX y CPSL+GX). También se hallaron opiniones distintas al analizar las intenciones de consumo y compra, destacando que la primera alcanzó el 90% para el pan con GX según los consumidores celíacos y la muestra con CPSL+GX resultó la más elegida por los no celíacos (96%). La mayor intención positiva de compra fue para la formulación con GX (80%) según los participantes celíacos y el pan con CPSL+GX alcanzó el 89% para los no afectados por la patología.

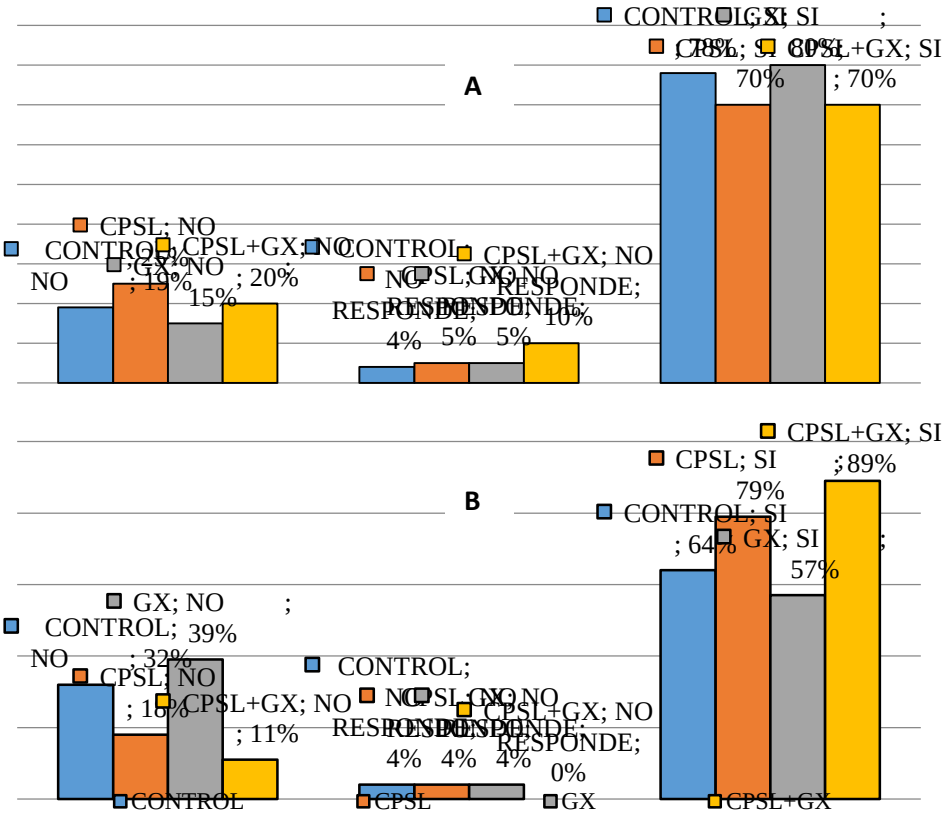


Figura 2. Intención de compra medida por consumidores celíacos (A) y no celiacos (B), para panes sin TACC elaborados con harina de algarroba negra y adición de CPSL y/o GX.
A: (*n*=28); B: (*n*=27). NO: no compraría. SI: si compraría.

Calidad sensorial
Para complementar el análisis sensorial de las formulaciones desarrolladas en este trabajo, se muestran a continuación los resultados de calidad sensorial para los panes sin TACC, realizado con el objeto de calificar los principales atributos del pan de una manera analítica y objetiva.
Los atributos evaluados fueron tomados de la bibliografía y se resumen en la **Tabla 5** junto con los puntajes consensuados y los resultados para cada muestra libre de gluten desarrollada.
Apariencia
Para la apariencia (máximo = 25 puntos), el mayor puntaje fue obtenido por la muestra con CPSL+GX, resultando significativamente diferente a la muestra control ($p<0,05$), pero similar a CPSL y GX. Se halló

alta y significativa correlación entre apariencia y aceptabilidad general (r= 0,98; ***p<0,001).
La forma de la rodaja alcanzó una puntuación casi perfecta para los dos panes con GX y muy inferior (p<0,05) para el pan control. Es importante destacar que este atributo encontró fuerte relación con la aceptabilidad general (r= 0,98; ***p<0,001), el atributo textura (r= 0,98; ***p<0,001) y la apariencia (r= 0,99; ***p<0,001).
El puntaje asignado a las muestras según la homogeneidad de la miga (**Tabla 5**) fue estadísticamente superior para los dos panes con agregado de GX respecto al patrón (p<0,05).
El pan con CPSL no resultó diferente a las demás muestras. Este parámetro se correlacionó también con la aceptabilidad general (r= 0,98; ***p<0,001) y el atributo textura (r= 0,98; ***p<0,001), obteniendo una correlación casi perfecta con éstas.
Para los panelistas semi-entrenados, el color resultó una variable con poco peso en la valoración de la apariencia (5 puntos) (**Tabla 7**), sin embargo, apreciaron que los panes con GX merecieron un mejor puntaje para color (p<0,05) respecto a la muestra control. El pan con CPSL no resultó diferente a las demás formulaciones.
La variación en la apreciación del color de la miga se debió a la forma en que se percibían los panes con GX y CPSL+GX, argumentando que al ser más aireados, resultaban menos oscuros. Esto coincidió con la opinión de los consumidores celíacos, a los que les resultó mejor el color de los panes con CPSL+GX (**Tabla 4**).

Sabor

Según lo consensuado por el panel semi-entrenado, el total de la puntuación asignada para el sabor fue del 30%, siendo el pan CPSL+GX la muestra más cercana al óptimo (29,00±0,75), resultando significativamente mejor que las formulaciones control y con CPSL (p<0,05) para este parámetro. Los evaluadores opinaron que este pan presentó sabor lacteado, suave, dulce y/o a café o a cereal tostado lo que podría deberse a la mayor cantidad de leche adicionada en la formulación y al sabor típico de la harina de algarroba negra.
Se observaron altas correlaciones entre calidad de sabor vs. aceptabilidad general (r= 0,99; ***p<0,001) y la aceptabilidad de sabor vs. calidad del sabor (r= 0,93; ***p<0,001).
Los evaluadores dieron una menor puntuación al pan control (21,75±2,13; **Tabla 5**) porque apreciaron que estas muestras presentaron un sabor tostado muy marcado.

Tabla 5. Calidad sensorial de panes sin TACC elaborados con harina de algarroba negra y adición de CPSL y/o GX.

ARTIBUTO	Puntaje consensuado	MUESTRA			
		CONTROL	CPSL	GX	CPSL+GX
APARIENCIA	**25**	18,13±3,20ª	21,88±2,25b	23,69±1,62b	23,75±2,35b
Forma de la rodaja	10	7,63±2,03ª	8,88± 1,09b	9,88±0,34b	9,75±1,00b
Homogeneidad	10	6,69±2,15ª	8,31± 1,82ab	8,75±1,61b	8,88±2,06b
Color	5	3,88±1,09ª	4,44± 0,81ab	4,88±0,34b	4,81±0,40b
SABOR	**30**	21,75± 2,13ª	24,44± 2,62a	27,81±2,05b	29,00±0,75b
AROMA	**10**	9,81±2,07ª	9,44± 1,03a	9,69±0,70a	9,75±0,68a
TEXTURA	**35**	21,44±5,11ª	26,44± 5,85b	32,94±3,07c	33,44±2,63c
Dureza	15	10,06±3,17ª	11,94± 3,21ab	13,88±2,06b	14,19±1,72b
Elasticidad	10	5,06±0,93ª	7,50± 1,07b	8,63±2,42bc	9,44±1,36c
Friabilidad	10	4,94±1,34ª	6,75± 2,14b	9,75±0,45c	9,75±0,68c
PUNTAJE TOTAL OBTENIDO		**71,13±1,88ª**	**82,19±2,80b**	**94,13±1,54c**	**95,94±3,23c**

Valor medio ± D.E. (*n=8*). Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas (p<0,05).
CPSL: Pan con concentrado de proteínas de suero lácteo; GX: Pan con goma xántica.

Aroma

Para el atributo aroma se fijó un puntaje máximo de 10 puntos (**Tabla 5**), siendo la característica con menor peso en la puntuación total. Todas las formulaciones de pan sin TACC estudiadas registraron valores cercanos al máximo, por lo que dicha característica no presentó diferencias significativas en el análisis estadístico según el tipo de pan. Entre las opiniones de los evaluadores se destacó que el aroma de los panes fue a levadura y/o a cereal tostado.

Textura

El atributo textura (**Tabla 5**) fue el parámetro de mayor peso en la calidad sensorial. El pan patrón registró el menor valor ($p<0,05$) seguido por la muestra CPSL. Los dos panificados con GX lograron acercarse al máximo establecido. Los panes patrón obtuvieron los menores puntajes porque resultaron poco elásticos, secos, de miga apelmazada (o poco aireada) y altamente desmoronables. Los panes con CPSL fueron calificados como secos y de miga compacta. Mientras que los productos adicionados con GX se describieron como elásticos, húmedos, aireados y blandos. La calidad de textura se correlacionó fuertemente la aceptabilidad general ($r= 0,99$; ***$p<0,001$) y la aceptabilidad para textura ($r= 0,99$; ***$p<0,001$).

El atributo textura estuvo compuesto por tres sub-categorías. La primera fue la dureza de la miga (**Tabla 5**) a la se le asignó un máximo de 15 puntos, considerando este valor para la miga con dureza ideal. La puntuación para el pan control resultó significativamente menor ($p<0,05$) respecto a las obtenidas por las muestras con adición de hidrocoloide. La formulación con CPSL logró un score intermedio. La dureza se correlacionó fuertemente con la aceptabilidad general ($r= 1$; ***$p<0,001$), la aceptabilidad para textura medida por consumidores y panelistas ($r= 0,98$; ***$p<0,001$ - $r= 1$; ***$p<0,001$ respectivamente) y la apariencia ($r= 0,98$; ***$p<0,001$). Los evaluadores informaron que la puntuación para el pan control se vio afectada por la poca cohesividad de la miga, dado que la sensación en boca no era propia a la del pan, sino a la de un producto desmoronable y seco. Algo similar sucedió con la muestra CPSL, sólo que este pan logró mejor puntaje por resultar menos friable que el patrón. Los panes con goma alcanzaron scores muy cercanos al máximo fijado, siendo el pan CPSL+GX el de mayor puntuación, aunque la diferencia no fue significativa. Los evaluadores opinaron que estos productos presentaron una dureza ideal ya que no se desintegraron ante el primer mordisco, tampoco requirieron demasiada fuerza para deformarlos y se percibieron más húmedos, por lo que se asemejaron más a un pan convencional.

Para la elasticidad de la miga (**Tabla 5**) se estableció un valor de 10 puntos. El pan CPSL+GX alcanzó 9,44 puntos, siendo significativamente el de mayor score ($p<0,05$) para esta característica. Los evaluadores describieron la miga como cohesiva y húmeda, pero no gomosa. Los panes control sólo alcanzaron la mitad de la puntuación consensuada, dado que resultaron altamente friables, sin capacidad de recuperación posterior a la presión. La elasticidad de la miga se correlacionó altamente con la aceptabilidad general ($r= 0,99$; ***$p<0,001$) y de textura ($r= 0,97$; ***$p<0,001$).

El atributo friabilidad, fue considerado con un valor máximo de 10 puntos, las formulaciones con GX registraron puntaje muy cercano al ideal, ya que resultando cohesivas elásticas y blandas. El pan control no superó la mitad de la puntuación; los evaluadores percibieron poca cohesión en la miga, tanto de forma manual como en la boca. Destacaron que la miga del pan patrón simulaba la textura de una masa sablé o un budín, pero menos húmeda. La puntuación para el grado de desmoronamiento de la miga se correlacionó fuertemente con la elasticidad sensorial ($r= 0,96$; ***$p<0,001$ respectivamente), la aceptabilidad general ($r= 0,98$; ***$p<0,001$) y de forma perfecta con la del atributo textura ($r= 1$; ***$p<0,001$).

Calidad sensorial total

La calidad sensorial total de cada muestra se calculó como la sumatoria de los puntajes alcanzados por cada atributo (apariencia, sabor, aroma y textura), considerando los 100 puntos como el máximo.

El producto tomado como patrón logró una calificación de 71,13±1,88 (**Tabla 5**), resultando significativamente menor ($p<0,05$) al de las demás muestras. Este pan fue descripto como de poco volumen, miga densa, buen sabor y aroma, con textura blanda, poco elástica y altamente friable.

La muestra con adición de CPSL fue definida como de mejor volumen, de miga homogénea, aunque poco aireada, buen sabor, aroma y textura blanda, elástica y friable, alcanzando un puntaje de 82,19±2,80, el cual superó significativamente ($p<0,05$) al pan control.

El pan con agregado de GX logró una puntuación mayor (94,13±1,54; $p<0,05$) a los anteriores, ya que según los evaluadores, la miga fue aireada, homogénea, de buen sabor y aroma y de textura blanda, elástica y húmeda. El mayor puntaje fue para la formulación CPSL+GX (95,94±3,23), resultando significativamente mayor ($p<0,05$) a las primeras, pero no diferente a la del pan elaborado sólo con hidrocoloide. Los evaluadores apreciaron que esta muestra fue la de características más similares a las del pan de trigo, ya que se destacó por la elasticidad de la miga, que además fue descripta como muy aireada, homogénea, húmeda, de excelente sabor, buen aroma y firmeza ideal.
La calidad sensorial total se correlacionó alta y significativamente la aceptabilidad global ($r= 0,99$; ***$p<0,001$).

CONCLUSIONES

Los panes formulados resultaron aceptables para los consumidores celíacos y no celíacos, con altos porcentajes de consumo y compra, mientras que los evaluadores apreciaron que la muestra CPSL+GX logró características más similares a las del pan de trigo, ya que se destacó por la elasticidad de la miga, que además fue descripta como muy aireada, homogénea, húmeda, de excelente sabor, buen aroma y firmeza ideal. Este trabajo intenta ser un firme antecedente para la promoción de la algarroba negra como valioso producto propio de la región norte de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

Gallagher E, Gormley TR, y Arendt EK. (2004). Recents advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. Trends in Food Science and Technology, 15, 143-152.
González Galán A, Abreu CMP, y Duarte Correa A. (2008). Caracterización química de la harina del fruto de Prosopis spp. procedente de Bolivia y Brasil. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 58(3), 309-315.
Kittisuban P, Ritthiruangdej P, y Suphantharika M. (2014). Optimization of hydroxyproylmethylcellulose, yeast β-glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. LWT – Food Science and Technology, 57, 738-748.
Lazaridou A, Duta D, Papageorgiou M, Belc N, y Biliaderis CG. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. Journal of Food Engineering, 79(3), 1033-1047.
Margalef MI, Tóffoli SL, Burgos VE, Campos A, Valdez Clinis GA, y Jiménez MJ. (2012). Algarroba Negra (Prosopis nigra): Caracterización fisicoquímica y elaboración de productos dietéticos. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, 1(2), 14-19.
Matos Segura, ME (2013). Tesis Doctoral. Formulación y desarrollo de productos horneados libres de gluten a base de harina de arroz enriquecido con proteínas. Universidad Politécnica de Valencia, España.
Mohammadi M, Sadeghnia N, Azizi M-H, Neyestani T-R, y Mortazavian AM. (2014). Development of gluten-free bread using hydrocolloids: Xanthan and CMC. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 20, 1812-1818.
Nunes ME, Ryan LAM, y Arendt EK. (2009). Effect of low lactose dairy powder addition on the properties of gluten –free batters and bread quality. European Food Research and Technology, 229, 31-41.
Rodriguez Furlán LT, Padilla AP, y Campderrós ME. (2015). Improvement of gluten-free bread properties by the incorporation of bovine plasma proteins and different saccharides into the matrix. Food Chemistry, 170, 257-264.
Sciarini LS, Ribotta PD, León AE y Pérez GT. (2012). Incorporation of several additives into gluten free breads: Effect on dough properties and bread quality. Journal of Food Engineering, 111, 590-597.
Trevisson M. (1992). Evaluación Nutricional de Frutos de Tres Especies de Algarrobos. Disponible en: www.fao.org/docrep/006/ad314s/ad314s07.htm. [Último acceso]: julio 2016.

Efecto de la estación de cosecha sobre la calidad integral de berenjena violeta durante su desarrollo

Valerga L. [1], Darré M. [1], Zaro M.J. [1], Vicente A. [1, 2], Lemoine M.L. [1, 2], Concellón A. [1]

(1) CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos), CONICET- CCT La Plata, CIC-PBA, Fac. Cs. Exactas-UNLP. La Plata, Argentina.
(2) LIPA (Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales), Fac. Cs Agrarias y Forestales-UNLP. La Plata, Argentina.
luciavalerga@hotmail.com

RESUMEN

La planta de berenjena es de ciclo anual, de climas cálidos y su período de cosecha abarca las estaciones de primavera y otoño. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del estado de desarrollo y estación de cosecha sobre la tasa de crecimiento, el tamaño y la calidad de berenjena violetas *cv.* Monarca. Los frutos se cosecharon en tres estados de desarrollo de acuerdo al tamaño al alcanzar una longitud de 0,09, 0,17 y 0,21 m, para los estados baby (E1), comercial (E2) y avanzado (E3), respectivamente. A lo largo del ciclo productivo, se efectuaron tres cosechas en las distintas estaciones: primavera (P), verano (V) y otoño (O). Se evaluó la tasa de crecimiento, el tamaño (peso y diámetro) y parámetros de calidad como tasa de respiración, materia seca, color de piel, firmeza, textura de pulpa, tamaño y contenido de semillas. En los tres estados de desarrollo la velocidad de la tasa de crecimiento se redujo con el avance de las estaciones de cosecha. Las mejores características de calidad se alcanzaron en la temporada de verano, cuando la planta ha completado su desarrollo vegetativo y los recursos se dirigen principalmente a la producción de frutos. Las condiciones menos favorables durante el otoño, dadas por las bajas temperaturas y el agotamiento de la planta al final de su ciclo de producción, determinaron una lenta tasa de crecimiento y la obtención de frutos de menor tamaño, mayor firmeza y calidad reducida.

Palabras clave: hortalizas, temporada de cosecha, color, firmeza, semillas.

ABSTRACT

Eggplant has an annual cycle of production and needs hot weather to its correct development. The harvest period occurs between spring and autum. In this work we evaluated the effect of the harvest season (spring: november-dicember, summer: febrary-march and autum: april-may) on growth rate, size and quality of eggplant fruits in three developmental stages: baby (S1), commercial (S2) and advanced (S3). Fruits were harvested according to size when they reached 0.09, 0.17 and 0.21m of lenght for the stages S1, S2 and S3, respectively. The growth rate, size (weight and diameter) and quality parameters (respiratory rate, dry matter, skin color, firmness and seed content) were determínate. The growth rate decreased with the advancing of the harvest season in the three development stages. The best quality characteristics were achieved in the summer season when the plant has completed its vegetative development and resources are mainly directed to the production of fruit. The less favorable development conditions were during autumn due to the lower temperature and exhaustion of the plant at the end of its production cycle, which determined smaller, firmer and low quality fruits.

Keywords: vegetables, harvest season, color, firmness, eggplant seeds.

INTRODUCCIÓN

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es el tercer cultivo hortícola de importancia mundial dentro de las *Solanáceas*, luego de la papa y el tomate (Sekara et al. 2007). En los últimos años ha ganado popularidad por

sus características nutricionales, especialmente por ser una excelente fuente de compuestos antioxidantes (Scalzo et al. 2016). Si bien es una planta perenne, los cultivos se manejan de forma anual y su ciclo de producción abarca diferentes estaciones. En la zona de La Plata y Gran Buenos Aires la temporada de cosecha comienza en primavera (setiembre-octubre) y culmina a fines del otoño (mayo). Es sabido que las características climáticas estacionales como la temperatura, humedad o radiación solar pueden influir sobre la calidad de los vegetales (Raffo et al. 2006, Toor et al. 2006, Gaveh et al. 2011). Esto resulta de suma importancia en la planta de berenjena ya que especialmente requiere de climas cálidos para su crecimiento. La temperatura media donde el desarrollo es óptimo está comprendida entre 21-29ºC, mientras que por debajo de 13ºC se paraliza el desarrollo vegetativo (Nothmann y Koller 1975). Se conoce que en temporadas donde las temperaturas son muy bajas y los periodos de luz más cortos la floración y fructificación se encuentran retrasadas generando algunas anomalías en el desarrollo del fruto, como un menor peso final y poco contenido de semillas (Nothman y Koller 1975, Nothman et al. 1978, Chen y Li 1996, Kawasaki 2015). Si se analiza a través del ciclo de producción, en general se percibe que los frutos provenientes de las primeras recolecciones son de mejor calidad tal como ocurre con las cosechas tempranas de pimiento, alcaucil y pepino (Maalekuu, et al. 2004, Calabrese et al. 2005, Ekman et al. 2010). Si bien trabajos previos han evaluado el efecto de la época de recolección sobre la calidad de ciertos vegetales, no hay estudios que determinen si existen variaciones en la tasa de crecimiento y calidad de las berenjenas de acuerdo a la estación de cosecha. Así, en tomate se halló que la composición, firmeza y la calidad poscosecha de los frutos varía ampliamente de acuerdo al momento de cosecha (Raffo et al. 2006, Anza et al. 2006, Toor et al. 2006). Por su parte, Shou et al. (2011) establecieron que las diferentes características climáticas durante los meses que abarca la temporada de producción promueven cambios en la composición y la textura de espárragos. De forma similar, Borochov-Neori et al. (2009) observaron que las propiedades sensoriales y nutricionales del fruto de granada también se ven influenciadas por la estación de recolección. En este caso, los frutos tardíos mostraron mejores propiedades antioxidantes, color y jugosidad respecto de los recolectados en forma temprana.

Por otra parte, es sabido que el estado de desarrollo a cosecha también puede afectar la calidad de los vegetales. Las berenjenas se cosechan de acuerdo al tamaño en general cuando han alcanzado un 80% de su tamaño final a fin de maximizar la calidad y el rendimiento y antes que las semillas completen su desarrollo (Mohammed y Brecht 2003, Gajewski y Arasimowicz 2004). Esto demanda alrededor 15-35 días desde la floración hasta que alcanzan el calibre comercial dependiendo de la variedad, la temperatura y la intensidad de luz solar (Nothmann 1986). Sin embargo, las berenjenas pueden consumirse en todos los estados de desarrollo y frutos de tamaño pequeño o *baby* han comenzado a comercializarse generando un producto de valor agregado (Zaro et al. 2014). Previamente se ha hallado que estos frutos muestran una diferente sensibilidad a la baja temperatura en poscosecha respecto de los frutos en estado de desarrollo *comercial*, y en contraposición a lo esperado resultaron más tolerantes a las bajas temperaturas de almacenamiento (Zaro et al. 2014). En tanto se ha observado que las berenjenas que se dejan permanecer en la planta y se cosechan en un estado de desarrollo *avanzado* adquieren una textura dura y esponjosa, muestran mayor tamaño y número de semillas y resultan más amargos, determinando una menor aceptación (Gajewski y Arasimowicz 2004). Mas allá de esto no se conoce si las berenjenas obtenidas a través de las distintas estaciones de cosecha muestran una calidad diferencial según el estado de desarrollo.

De acuerdo a lo expuesto el objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en la tasa de crecimiento, tamaño y calidad de berenjenas cosechadas en las diferentes estaciones que abarca su ciclo de producción (*Primavera*, *Verano* y *Otoño*), analizando el desempeño de frutos en tres estados de desarrollo de interés: *baby*, *comercial* y *avanzado*.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se emplearon berenjenas violetas (*Solanum melongena L.*) cv. Monarca, provenientes de un invernadero de

la ciudad de La Plata, Argentina. Los plantines se sembraron en julio del 2015 y la temporada de cosecha abarcó los meses de noviembre 2015 a mayo 2016. Se realizaron tres cosechas consecutivas sobre una misma planta y se denominaron según el avance de las estaciones: *Primavera* (P, noviembre-diciembre), *Verano* (V, febrero-marzo) y *Otoño* (O, abril-mayo). La temperatura ambiente varió entre 14-26ºC, 14-25ºC y 5-15ºC en las cosechas de P, V y O, respectivamente. El riego y la fertilización se realizaron mediante un sistema de goteo. Se seleccionaron 6-7 hileras localizadas en la zona media del invernadero y se marcaron 180 frutos recién cuajados con cintas de colores, considerando a este como día 0. Como excepción en la temporada *Otoño* se marcaron al día cero frutos recién cuajados y frutos con cierto grado de desarrollo a fin de que, debido a la lenta velocidad de crecimiento, fuera factible completar la curva de crecimiento en el mes de estudio correspondiente. A continuación se contabilizaron los días luego del cuajado o fructificación (days after fruit set, DAFS) necesarios para lograr los tres estados de desarrollo definidos de acuerdo al tamaño en: E1= *baby*, E2= *comercial* y E3= *avanzado* de 0.09, 0,17 y 0,21 m de longitud, respectivamente. En cada temporada de cosecha se recolectaron 30 frutos correspondientes a cada estado de desarrollo y se efectuaron las determinaciones detalladas a continuación.

Peso y diámetro

Los frutos se pesaron en una balanza digital (Kern 572, Argentina). Se midió el diámetro en la zona ecuatorial con un calibre Vernier. Se analizaron 15 frutos por tratamiento. Los resultados se expresaron en Kg y m, respectivamente.

Respiración

Los frutos se colocaron dentro de un frasco de vidrio hermético y se determinó la producción de CO_2 con un sensor infrarrojo IR (Compu-Flow, Modelo 8650, USA) al inicio y luego de una incubación (15 min a 20°C). Las medidas se realizaron por cuadruplicado. Los resultados se expresaron en mg CO_2/kg h.

Color superficial

Se evaluó en la piel de los frutos empleando un colorímetro (Minolta CR-400, Japón) obteniendo los parámetros L* y a*. Las medidas se realizaron por triplicado en 10 frutos pertenecientes a cada estado de desarrollo y temporada de cosecha.

Materia seca

Aproximadamente 2 g de pulpa se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante. El contenido de materia seca (MS) se calculó por diferencia de peso. Las determinaciones se realizaron en 15 frutos por condición y los resultados se expresaron en porcentaje relativo al peso fresco.

Firmeza del fruto

Se analizó con texturómetro (TextureAnalyzer-TA.XT2 Stable Microsystem, USA). Se realizó un ensayo de ruptura efectuando una penetración de 8 mm de profundidad y velocidad constante de 1 mm/s sobre la zona ecuatorial o globosa del fruto sin pelar empleando una sonda plana de 3 mm de diámetro. Se registró la variación de la fuerza en función de la distancia de penetración. Las medidas se realizaron por triplicado en 10 frutos pertenecientes a cada estado de desarrollo y temporada de cosecha. Los resultados se expresaron como deformación (firmeza) en N/s.

Textura de la pulpa

Se analizó con texturómetro (TextureAnalyzer-TA.XT2 Stable Microsystem, USA). Se realizó un ensayo de compresión sobre cilindros de pulpa de 0,8 cm de espesor y 2,2 cm de diámetro tomados del centro de rodajas de la zona ecuatorial del fruto, en donde se aplicó un 30% de deformación y una velocidad de 0,5 mm/seg empleando una sonda de plato de 75 mm de diámetro. Las determinaciones se realizaron por triplicado en 10 frutos de cada condición. Los resultados se expresaron como deformación (firmeza) en N/s.

Tamaño, cantidad y área ocupada por semillas

Se cortaron rodajas de 5 mm de espesor de la zona ecuatorial del fruto. Se dejaron expuestas al aire durante 30 min para promover el pardeamiento de las semillas y se obtuvieron imágines escaneadas (HP deskjet F4480, Argentina). Empleando el analizador de imágenes ImageJ 1.37, se analizó la superficie de la rodaja ocupada por semillas, el tamaño y cantidad de las mismas. Los resultados se expresaron en % y cm^2, respectivamente. Se evaluaron 15 frutos por cada estado de desarrollo y temporada de cosecha.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los datos se analizaron por medio de un ANOVA con el software InfoStat y las medias se compararon con la prueba de LSD de Fisher a un nivel de significancia $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Curva de crecimiento

El patrón de crecimiento de las berenjenas mostro un comportamiento sigmoide simple característico (**Figura 1**). En P y V, cada estado de desarrollo se alcanzó en un período similar, mientras que en O se necesitó alrededor de 3 veces el tiempo requerido en las restantes estaciones para lograr los estados E1, E2 y E3, respectivamente (**Figura 1**). La menor velocidad de crecimiento en O puede asociarse a que la temperatura ambiente se encontraba en el límite mínimo en el que la planta de berenjena se desarrolla con normalidad (15-25ºC) (Chen y Li 1996). Los frutos cosechados en P y V, donde la temperatura ambiente fue similar y se ubicó entre 14 y 26ºC, tardaron 10 DAFS en alcanzar el E1. Mientras que los cosechados en O con una temperatura ambiente significativamente más baja (entre 5 y 15ºC) demoraron 26 DAFS. El E2 se alcanzó luego de 146, 20 y 52 DAFS en P, V y O, respectivamente. En tanto los frutos tardaron 19, 27 y 62 DAFS en llegar al E3 para las cosechas de P, V y O, respectivamente **(Figura 1**). En concordancia, Leonardi y Giuffrida (2010) observaron que berenjenas obtenidas durante los meses de primavera-verano tuvieron una rápida tasa de crecimiento y alcanzaron rápidamente el tamaño máximo respecto de aquellos frutos recolectados en otoño-invierno.

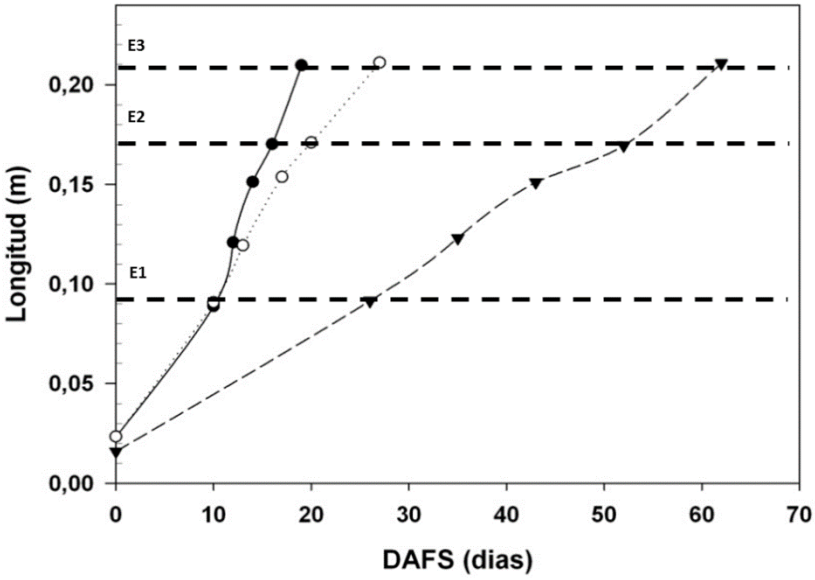


Figura 1. Curva de crecimiento de frutos cosechados en Primavera (P, ●), Verano (V, ○) y Otoño (O, ►). Con línea punteada se marcan los estados estudiados: E1 (*baby*), E2 (*comercial*) y E3 (*avanzado*). DAFS: days after fruit set (días luego de la fructificación).

Peso y diámetro

Las berenjenas se cosechan para su consumo de acuerdo al tamaño y en el presente trabajo los frutos se recolectaron según su longitud (**Figura 2A**). Si bien las berenjenas *baby* (E1) no mostraron un marcado efecto de la estación de cosecha sobre el tamaño, la estación de crecimiento afectó significativamente a los estados más avanzados de desarrollo (**Figura 2B** y **C**). En V se obtuvieron los frutos de mayor peso y

diámetro, seguidos por los recolectados en P. En el E2 los frutos de P fueron mayores en diámetro que los de O, aunque alcanzaron un peso similar. En el E3, los frutos cosechados en V a igual peso presentaron un mayor diámetro que los de P y estos alcanzaron a su vez mayor tamaño general que los de O. Cabe destacar que durante el ciclo del cultivo de berenjena existen grandes diferencias en términos de radiación solar y temperatura ambiente (Leonardi y Giuffrida 2010). En el presente trabajo la mayor cantidad de luz y temperatura durante las temporadas cálidas contribuyen a un mayor rendimiento y tamaño de los frutos, tal como ocurre en otros cultivos hortícolas como tomates, pepinos y calabacines respecto de las estaciones más frías (El-Mageed y Semida 2015). Por otra parte, dado que durante P y V la temperatura ambiente fue similar las diferencias se deberían a un efecto de la edad del cultivo. Así, al inicio del ciclo de producción (en P) los nutrientes se destinan en gran medida al crecimiento vegetativo de la planta, mientras que en V este se ha completado y los nutrientes se asignan preferentemente al desarrollo de frutos. En O las bajas temperaturas y el agotamiento del cultivo, podrían determinar el menor tamaño de los frutos. En concordancia, He et al. (1999) informaron una reducción de más del 55% del peso de tomates crecidos en otoño-invierno en comparación con el cultivo de primavera-verano.

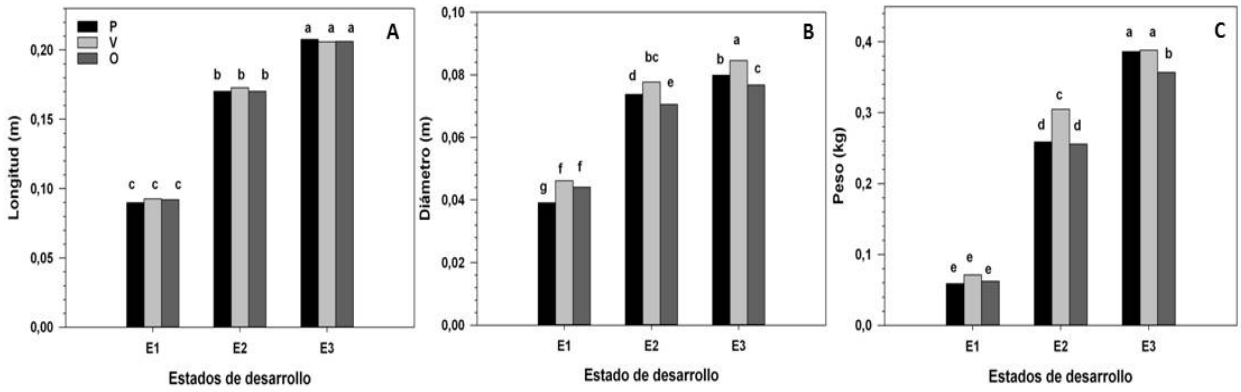


Figura 2. Longitud (A), diámetro (B) y peso (C) de los frutos cosechados en Primavera (P), Verano (V), y Otoño (O) para los estados E1 (*baby*), E2 (*comercial*) y E3 (*avanzado*). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Respiración, color de piel y materia seca

La tasa respiratoria de los vegetales a cosecha es influenciada por diversos factores tales como las condiciones de cultivo, el estado de desarrollo y el momento de cosecha (Fonseca et al. 2002, Zaro et al. 2014). En el presente trabajo los frutos mas inmaduros del E1 mostraron una alta tasa respiratoria, que disminuyó progresivamente con el desarrollo observándose un perfil no climatérico característico (**Tabla 1**). Previamente, Rodriguez et al. 1999 y Zaro et al. 2014 reportaron un comportamiento similar en berenjenas violetas. Asimismo, una significativa disminución de la tasa respiratoria fue observada a medida que se avanza en las estaciones de cosecha para todos los estados de desarrollo estudiados (**Tabla 1**). Seefeldt et al. (2012), también hallaron que inflorescencias de brócoli cosechadas al inicio de la temporada de verano mostraron una mayor tasa respiratoria que aquellas recolectadas en forma más tardía, y lo relacionaron a una mayor actividad fotosintética y a una rápida tasa de crecimiento en los períodos de cosecha con clima cálido. Las condiciones climáticas durante el crecimiento de los vegetales afectan el ritmo de desarrollo de la planta y la velocidad de asimilación de los hidratos de carbono consumidos en la respiración (Abney y Russo 1997, Seefeldt et al. 2012). En relación, el contenido de materia seca puede verse afectado por el momento de cosecha ya que este disminuye al aumentar la temperatura ambiente en línea con un mayor consumo de asimilados dado por la mayor tasa metabólica y velocidad de crecimiento (Tijskens et al. 2003). En concordancia, salvo para el E1 un menor contenido de materia seca fue hallado en las berenjenas cosechadas en P y V, respectos de aquellos frutos recolectados en O, estación en la que la temperatura y la tasa de

crecimiento fueron menores (**Tabla 1**).

Tabla 1. Respiración, color de piel (L* y a*) y materia seca de los frutos cosechados en Primavera (P), Verano (V), y Otoño (O) para los estados E1 (*baby*), E2 (*comercial*) y E3 (*avanzado*). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de P < 0,05.

Estado	**Respiración ($mg\ CO_2/kg\ h$)**			**L***			**a***			**Materia seca (%)**		
	P	**V**	**O**	**P**	**V**	**O**	**P**	**V**	**O**	**P**	**V**	**O**
E1	$116±9^{a}$	$87±12^{b}$	$47±9^{cd}$	$25,6±1,0^{a}$	$25,2±0,7^{b}$	$24,6±0,7^{c}$	$3,7±0,7^{cd}$	$3,3±0,3^{e}$	$3,9±0,7^{c}$	$5,8±0,6^{a}$	$5,3±0,4^{bc}$	$4,8±0,4^{de}$
E2	$54±4^{c}$	$39±3^{d}$	$18±4^{e}$	$24,4±1,2^{cde}$	$24,1±0,6^{def}$	$23,9±0,7^{fg}$	$4,5±0,8^{b}$	$4,1±0,3^{c}$	$4,7±0,9^{de}$	$5,1±0,5^{cd}$	$5,0±0,5^{cde}$	$5,6±0,5^{ab}$
E3	$41±3^{d}$	$42±4^{d}$	$20±5^{e}$	$24,5±0,6^{cd}$	$23,6±0,6^{g}$	$24,0±0,8^{efg}$	$5,5±0,4^{a}$	$3,6±0,3^{de}$	$4,0±0,9^{c}$	$5,3±0,8^{bc}$	$5,3±0,8^{bc}$	$5,5±0,5^{ab}$

El color de las berenjenas está determinado por la presencia de antocianinas derivadas de la delfinidina, su contenido se define en estados intermedios de desarrollo y se ha observado que las berenjenas *baby* tienen un menor nivel de pigmentos respecto de frutos de mayor tamaño (Zaro et al. 2014). En concordancia, para todas las estaciones de cosecha los frutos del E1 se caracterizaron por mostrar una luminosidad (L*) significativamente más alta que los E2 y E3 **(Tabla 1**). En tanto, los frutos cosechados en P independientemente del estado de desarrollo presentaron una alta luminosidad y los cosechados en O resultaron en general los más opacos (**Tabla 1**). La época de cosecha muestra efecto sobre el color (a*) de las berenjenas, observando se que en todos los tamaños los frutos cosechados en V presentaron un color más violeta dado por un menor valor a* (menos rojo) (**Tabla 1**).

Firmeza

Tanto la época de cosecha como el estado de desarrollo afectaron las propiedades mecánicas de los frutos. Las berenjenas de los estados más avanzados (E2 y E3) y cosechadas en O presentaron el mayor nivel de firmeza externa. Contrariamente las berenjenas del E1 resultaron más firmes al inicio de la temporada de cosecha (P) (**Tabla 2**). En cuanto a la pulpa, los frutos de todos los estados de desarrollo cosechados en O también mostraron la mayor deformación siendo esta en los frutos de los E2 y E3, entre 2 y 4 veces mayor respecto de los cosechados en P (**Tabla 2**). Este comportamiento podría relacionarse en épocas de baja temperatura a una mayor rigidez del fruto ante una creciente deshidratación o pérdida de turgencia, o bien debido al desarrollo de un tejido más lignificado.

Tabla 2. Firmeza del fruto y de la pulpa de frutos cosechados en Primavera (P), Verano (V), y Otoño (O) para los estados E1 (*baby*), E2 (*comercial*) y E3 (*avanzado*). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de P < 0,05. sd=sin dato.

Estado	**Deformación del fruto (N/s)**			**Deformación de la pulpa (N/s)**		
	P	**V**	**O**	**P**	**V**	**O**
E1	$4,5±0,4^{c}$	$3,9±0,3^{e}$	$4,1±0,6^{de}$	$13,7±1,7^{b}$	sd	$15,7±2,7^{a}$
E2	$3,4±0,5^{f}$	$4,3±0,6^{cd}$	$5,2±0,6^{b}$	$5,4±0,8^{d}$	sd	$9,9±1,7^{c}$
E3	$3,0±0,4^{g}$	$4,3±0,6^{cd}$	$6,8±0,8^{a}$	$3,1±1,2^{e}$	sd	$14,3±3,6^{b}$

Tamaño, cantidad y área ocupada por semillas

Desde un punto de vista sensorial, las berenjenas deben presentar al momento de cosecha semillas pequeñas, poco desarrollas y de color blanquecino para una mayor aceptación. Previamente se ha descripto que frutos sobremaduros que se dejan permanecer en la planta por un prolongado período de tiempo, desarrollan semillas de gran tamaño y con una cubierta lignificada (Gajewski y Arasimowicz 2004). Sin embargo, en el presente trabajo pudo observarse que el contenido de semillas fue independientemente del estado de desarrollo, mientras que la estación de cosecha afectó significativamente su contenido y tamaño (**Figura 3**). Así, las berenjenas cosechadas en V presentaron un área de rodaja ocupada por semillas significativamente

mayor a aquellas recolectadas en P y O, (**Figura 3A**). Esto se correlacionó además con una mayor área individual de semilla (**Figura 3 B**) y número de las mismas por superficie de la rodaja (**Figura 3C**). En todos los casos las semillas tuvieron una apariencia aceptable al no estar excesivamente desarrolladas ni lignificadas (datos no mostrados). El diferente comportamiento estacional puede deberse a que en P la planta destina sus nutrientes predominantemente al crecimiento vegetativo y no a los frutos, mientras que en O se cuenta con una planta de edad avanzada y en un ambiente de baja temperatura que puede afectar la viabilidad el polen y con ello se reduce la producción de semillas y frutos. Finalmente, mientras que el área ocupada de rodaja y el número de semillas no se modifican, el tamaño se incrementa en todas las estaciones de cosecha en línea con el crecimiento del fruto (**Figura 3**).

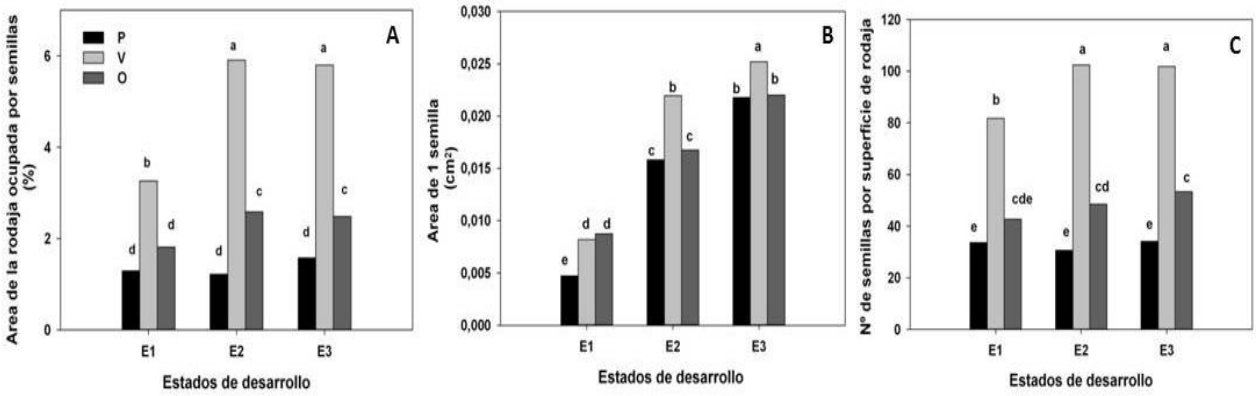


Figura 3. Área de la rodaja ocupada por semillas (A), tamaño de semilla (B) y número de semillas por área de rodaja (C) de los frutos cosechados en Primavera (P), Verano (V), y Otoño (O) para los estados E1 (*baby*), E2 (*comercial*) y E3 (*avanzado*). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de P < 0,05.

CONCLUSIONES

En los tres estados de desarrollo la velocidad de la tasa de crecimiento y la respiración de los frutos se redujeron con el avance de las estaciones de cosecha. Las mejores características de tamaño se alcanzaron en la temporada de V, cuando la planta ha completado su desarrollo vegetativo y los recursos se dirigen principalmente a la producción de frutos, determinando un mayor rendimiento en peso respecto de la P y el O. Las condiciones menos favorables durante el O, bajas temperaturas e inicio de la senescencia de la planta al final de su ciclo de producción, determinaron una lenta tasa de crecimiento y la obtención de frutos de menor tamaño, mayor firmeza y calidad global reducida.

BIBLIOGRAFIA

Abney TD, Russo VM. 1997. Factors affecting plant height and yield of eggplant. Journal of Sustainable Agriculture, 10(4): 37-48.

Anza M, Riga P, Garbisu C. 2006. Effects of variety and growth season on the organoleptic and nutritional quality of hydroponically grown tomato. Journal of Food Quality, 29(1): 16-37.

Borochov-Neori H, Judeinstein S, Tripler E, Harari M, Greenberg A, Shomer I, Holland D. 2009. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. Journal of Food Composition and Analysis, 22(3): 189-195.

Calabrese N, De Palma E, Bianco V. 2005. Yield and quality of seed propagated artichoke hybrid cultivars grown for four years. Acta Horticulturae, 681: 135-142.

Chen N, Li H. 1996. Cultivation and breeding of eggplant. In: Training Workshop on Vegetable Cultivation and Seed Production. http://203.64.245.61/fulltext_pdf/eam0137.pdf

Ekman J, Pristijono P, Parks S, Jarvis J. 2010. Growing conditions affect postharvest quality of greenhouse cucumbers. Acta Horticulturae, 877: 181-186

El-Mageed T, Semida WM. 2015. Effect of deficit irrigation and growing seasons on plant water status, fruit yield and water use efficiency of squash under saline soil. Scientia Horticulturae, 186: 89-100.

Fonseca S, Oliveira F, Brecht J.K. 2002. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. Journal of Food Engineering, 52: 99–119.

Gajewski M, Arasimowicz D. 2004. Sensory quality of eggplant fruits (*Solanum melongena* L.) as affected

by cultivar and maturity stage. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 3: 13/54.
Gaveh E, Timpo G, Agodzo S, Shin DH. 2011. Effect of irrigation, transplant age and season on growth, yield and irrigation water use efficiency of the African eggplant. Horticulture, Environment and Biotechnology, 52(1): 13-28.
He Y, Terabayashi S, Asaka T, Namiki T. 1999. Effect of restricted supply of nitrate on fruit growth and nutrient concentrations in the petiole sap of tomato cultured hydroponically. Journal of Plant Nutrition, 22(4-5): 799-811.
Kawasaki Y. 2015. Fruit Set and Temperature Stress. In: Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants.pp. 87-99. Springer Japan
Leonardi C, Giuffrida F. 2008. Growth rate and carpometric characteristics during eggplant fruit growth. In: International Symposium on Strategies Towards Sustainability of Protected Cultivation in Mild Winter Climate 807. pp. 175-180.
Maalekuu K, Elkind Y, Tuvia-Alkalai S, Shalom Y, Fallik E. 2004. The influence of harvest season and cultivar type on several quality traits and quality stability of three commercial sweet bell peppers during the harvest period. Advances in Horticultural Science, 21-25.
Mohammed M, Brecht J. 2003. Immature fruit vegetables. In: Postharvest physiology and pathology of vegetables. 2nd edition. Bartz, J., Brecht, J. (eds.). Marcel Dekker, New York. pp. 671-690.
Nothmann J, Koller D. 1975. Effects of low-temperature stress on fertility and fruiting of eggplant (*Solanum melongena*) in a subtropical climate. Experimental Agriculture, 11(01): 33-38.
Nothmann J, Rylski I, Spigelman M. 1978. Effects of air and soil temperatures on colour of eggplant fruits (*Solanum melongena* L.). Experimental Agriculture, 14(03): 189-195.
Nothmann J. 1986. Eggplant. In: Handbook of fruit set and development. Monselise, S. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp 145-152.
Raffo A, LaMalfa G, Fogliano V, Madani G, Quaglia G. 2006. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). Journal of Food Composition and Analysis, 19: 11–19.
Rodriguez S, López B, Chaves A, 1999. Changes in polyamines and ethyl-ene during the development and ripening of eggplant fruits (*Solanum melongena* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 1431–1434.
Scalzo R, Fibiani M, Francese G, D'Alessandro A, Rotino G, Conte P, Mennella G. 2016. Cooking influence on physico-chemical fruit characteristics of eggplant (*Solanum melongena* L.). Food Chemistry, 194: 835-842.
Seefeldt H, Løkke M, Edelenbos M. 2012. Effect of variety and harvest time on respiration rate of broccoli florets and wild rocket salad using a novel O_2 sensor. Postharvest Biology and Technology, 69: 7-14.
Sekara A., Cebula S, Kunicki E. 2007. Cultivated eggplants - origin, breeding objectives y genetic resources, a review. Folia Horticulturae, 19: 97-114.
Shou S, Lu G, Huang X. 2007. Seasonal variations in nutritional components of green asparagus using the mother fern cultivation. Scientia Horticulturae, 112(3): 251-257.
Tijskens L, Veltman RH, Heuvelink E, Simcic M. 2003. Modelling postharvest quality behaviour as affected by preharvest conditions. Acta Horticulturae, 599: 469–477.
Toor R, Savage G, Lister C. 2006. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. Journal of Food Compostion and Analysis, 19: 1–10.
Zaro MJ, Keunchkarian S, Chaves A, Vicente A, Concellón, A. 2014. Changes in bioactive compounds and response to postharvest storage conditions in purple eggplants as affected by fruit developmental stage. Postharvest Biology and Technology, 96: 110-117.

Comportamiento antioxidante de capsaicinoides puros y de las matrices naturales que los contienen

Wierna V.[1], Nazareno M. A.[2], Bonini N. A.[1]

(1) INIQUI-CONICET, Salta, Argentina.
(2) CITSE-UNSE, Sgo. de Estero, Argentina
victoriawierna@gmail.com

RESUMEN

Mediante distintos ensayos se evaluó el comportamiento antioxidante de capsaicinas naturales puras (Aldrich) y de matrices que las contienen tales como los frutos de ají pungente seco y molido y sus extractos (oleorresina, ORP-p). Se demostró que la presencia de capsaicinoides es responsable de la capacidad reductora evaluada por los métodos FRAP y Folin-Ciocalteu (F-C). Sin embargo, pudo observarse que en las muestras naturales existen otros compuestos fenólicos, distintos a los capsaicinoides, capaces de reducir al reactivo de F-C pero que no presentan acción reductora frente al ión Fe(III). Se determinó, además, que las capsaicinas presentan una acción antirradicalaria moderada y de cinética muy lenta frente a los radicales $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$. Sobre las muestras naturales, se concluyó que existe un efecto sinérgico de la matriz que conducen a un aumento de la acción antirradicalaria atribuible a la presencia de otros fenoles y carotenoides. El método de decoloración del *β-caroteno*, permitió demostrar que las capsaicinas puras presentan comportamiento antioxidante; sin embargo, este método, no resultó adecuado sobre las oleorresinas coloreadas de *Capsicum*; ya que sus carotenoides interfieren en la medición y compiten frente a la reacción del *β*-caroteno.

Palabras claves: *Capsicum*, capsaicinoides, actividades antirradicalaria y antioxidante.

ABSTACT

The antioxidant behaviour of pure natural capsaicins as well as of natural matrices of chilli fruits and its oleoresin (ORP-p) was evaluated through several assays. The presence of capsaicinoids was demonstrated to be responsible of the reducing capacity evaluated through FRAP and Folin-Ciocalteu methods. Natural samples, however, present other phenolic compounds, different from capsaicinoids, capable of reducing the F-C reagent but not the Fe(III) ion. Moreover, it was determined that capsaicins have a moderate antiradical activity with very low kinetics against $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ radicals. On natural samples, it is concluded that there is a synergistic effect of the matrix leading to an increase antiradical action. This was attributed to the presence of phenols and carotenoids in these matrices. Further, it was concluded that capsaicins have an antioxidant action through the *β*-carotene bleaching method. However, this method was not suitable on colored samples from *Capsicum*; because their carotenoids interfere with the measurement and compete in the reaction of *β*-carotene.

Keywords: Capsicum, capsaicinoids, antiradical and antioxidant activities.

INTRODUCCIÓN

Un compuesto antioxidante se define como toda aquella sustancia que hallándose en bajas concentraciones con respecto a la de un sustrato oxidable, retarda o previene su oxidación; y se agrega con el objeto de evitar las degradaciones oxidativas que disminuyen la calidad de un alimento. Entre ellos, los antioxidantes sintéticos son frecuentemente cuestionados por sus potenciales efectos toxicológicos y/o cancerígenos (Ito et. al 1983); lo que incentiva la búsqueda de nuevas sustancias antioxidantes a partir de fuentes naturales (Nazareno et al. 2011).

Los capsaicinoides, responsables de la sensación picante en frutos de *Capsicum*, se encuentran entre los monofenoles pertenecientes al conjunto de alcaloides de la familia de las vainillilamidas; siendo los más abundantes en las variedades pungentes la capsaicina (C) y la dihidrocapsaicina (DHC); las que normalmente se presentan en una proporción del 65-70% y del 35-30% respectivamente (**Figura 1**).

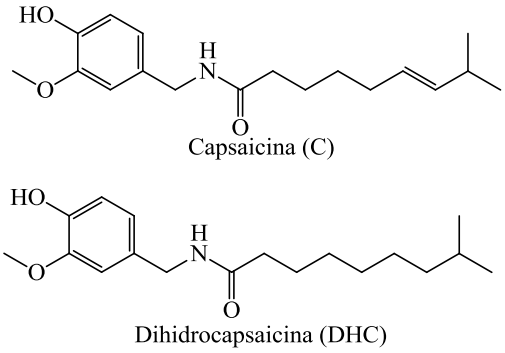


Figura 1. C y DHC difieren entre sí en la estructura de la cadena del componente ácido.

Por su estructura fenólica, los capsaicinoides han sido reportados con capacidad antioxidante; aunque todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de acción a través del cual actúan estos compuestos. Así, se ha reportado que las capsaicinas inhiben la peroxidación de los lípidos promovida por el hierro (Murakami et al., 2001) y previenen tanto la oxidación del ácido oleico a temperaturas de cocción (Henderson y Henderson, 1992), como la formación de los hidroperóxidos generados por la auto-oxidación del ácido linoleico (Henderson et al., 1999).
El objetivo de este trabajo fue la evaluación, mediante distintos ensayos, del comportamiento antioxidante de las capsaicinas puras y de las matrices que las contienen, tales como sus oleorresinas pungentes o los frutos molidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis se realizaron sobre una muestra de *Capsicum frutescens* cultivada en condiciones de jardín de introducción en INTA-Cerrillos (Salta). A partir de ésta, se obtuvo una oleorresina pungente (ORP-p) mediante extracción por el método Soxhlet, utilizando acetona como extractante. Como material de referencia no pungente se utilizó una oleorresina proveniente de variedades dulces de pimentón (ORP-np).
Las muestras se extrajeron, por duplicado, en 10 ml etanol al 95%. La muestra de ají molido se extrajo al 2,0% p/v; la ORP-p al 0,5% p/v y la ORP-np al 1,0% p/v.

Equipos utilizados

Los espectros y las mediciones de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro UNICAM UV/VIS UV2, el cual cuenta con un software de adquisición de datos VISION versión 3.20 (Unicam Vision Software).
Los análisis cromatográficos se hicieron en un equipo de HPLC Lab-Alliance (Series III) acoplado a un detector de arreglo de diodos (Shimadzu SPD-M20A). Para la adquisición de datos se empleó el software Class-VP versión 6.14 SP1 (Shimadzu). El equipo cuenta con una válvula de inyección Rheodyne Modelo 7125. Los volúmenes de inyección fueron de 20µL.

Determinación del contenido de capsaicinoides en las muestras

La pungencia se determinó por HPLC en fase reversa empleando una columna C-18 (Zorbax-Eclipse XDB-C18) de 250 mm de largo y 4,6 mm de diámetro interno. La separación se realizó en condiciones isocráticas utilizando H_2O-CH_3CN (60:40) como fase móvil y un caudal de 1,1 ml/min. Los solventes utilizados fueron

de calidad HPLC. La detección se realizó a 280 nm.
Se empleó un patrón de capsaicinas naturales (Aldrich) con un 98% de pureza que contiene un 65% de C y un 35% de DHC. Para la construcción de la curva de calibración, se preparó una solución stock de 1000 ppm en etanol a partir de la cual se realizaron diluciones abarcando un rango de concentraciones entre 100-500 ppm. La curva se construyó con 5 puntos de concentración, cada uno por duplicado.
La pungencia se expresó como unidades Scoville (SHU, del ingés *Scoville Heat Units*), donde 1 ppm (p/p) de capsaicinoides totales equivalen a 15 SHU.

Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (F-C). Para ello, se tomó una alícuota del extracto de la muestra y se la llevó a un volumen de 1 mL con agua destilada. Se agregaron 0,65 mL de reactivo de F-C (1N) y 3,15 mL de la solución de Na_2CO_3 (20% p/v).

Luego de agitar se trató a 50ºC en baño de glicerina durante 10 min. La absorbancia de la mezcla se midió a 725 nm, frente a un blanco de reacción.

Se preparó una curva de calibración utilizando soluciones estándar de Acido Gálico (AG) de concentraciones comprendidas entre 3 y 14 µg AG/ml. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,9961. Los resultados fueron expresados como µg AG/mg (m.s.) de muestra seca. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

El ensayo se llevó a cabo, además, sobre las soluciones patrón de capsaicinas naturales para establecer una correlación en equivalentes de AG.

Poder reductor del catión férrico (FRAP)

El ensayo para la determinación de la actividad reductora, se realizó a pH neutro, conforme al método original del ferricianuro con incubación, descripto por Berker et al. (2007). Se tomó una alícuota de la solución de antioxidante o extracto de la muestra y se llevó a 1 mL con etanol (96%). Se agregaron 2,5 mL de buffer fosfato 0,2 M (pH= 6,6) y 2,5 mL de solución de $K_3Fe(CN)_6$ (1%) y se incubó por 20 min a 50ºC. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. La mezcla se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm. De la solución sobrenadante se tomaron 2,5 mL y se mezclaron con 2,5 mL de agua des-ionizada y 0,5 mL de solución de $FeCl_3.6H_2O$ al 0,1%. Las absorbancias de las soluciones coloreadas por formación del complejo "azul de Prusia" se midieron a 700 nm, luego de 2 min, contra un blanco de reactivo.

Se analizó, además, la actividad reductora frente a una solución patrón de capsaicinas naturales. Se utilizó una curva de calibración de $Fe(II)SO_4.7H_2O$ en un rango de concentraciones entre 0,75 y 11,35 µg/ml. Se realizó, además, una segunda curva de utilizando Trolox (como antioxidante de referencia) en el rango de concentraciones entre 0,35 y 13,38 µg/ml.

Ensayos asociados con la actividad antirradicalaria

Las propiedades antirradicalarias fueron avaluadas frente a los radicales DPPH• y ABTS+• mediante sendos métodos de decoloración. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Ensayo de captura del radical DPPH•

Este ensayo se realizó según el método propuesto por Brand-Williams et al., (1995). Se preparó una solución en metanol de DPPH• (ξ= 12500 $cm^{-1}M^{-1}$) con una absorbancia a 515 nm de 1,0 ± 0,1. Los ensayos se llevaron a cabo "in situ" dentro de la propia celda del espectrofotómetro. Para la determinación de la actividad anti-radicalaria, se agregaron alícuotas de los extractos alcohólicos a 3 mL de la solución de radical DPPH•. El decaimiento de la absorbancia a 515 nm fue monitoreado espectrofotométricamente, cada 30 s, durante 10 minutos. Para muestras coloreadas que presentaban absorbancia a la longitud de onda en la que se realiza la medición, se determinó su contribución mediante blancos de reacción. En todos los casos se tuvieron en cuenta los efectos de la dilución.

Ensayo de captura del radical ABTS+•

Este ensayo se realizó tomando como base el método propuesto por Re et al. (1999). Se tomó 1 mL de solución de reactivo ABTS (7 mM) y 3,42 mL de solución de $K_2S_2O_8$ (2,45 mM). Se llevó a un volumen de 10 mL con agua bidestilada y se mantuvo en la oscuridad por 16 h a temperatura ambiente. A partir de esta solución de stock, se preparó una dilución en etanol del radical ABTS•+ cuya absorbancia se ajustó a 1,0 ± 0,1 (ξ= 16000 $cm^{-1}M^{-1}$).

Se agregaron alícuotas de extractos alcohólicos de las muestras en 3 mL de la solución de ABTS•+ contenidos en la celda del espectrofotómetro. El decaimiento de la absorbancia a 734 nm fue monitoreado por espectrofotometría UV-Visible, en 20 ciclos, durante 10 minutos. Todas las mediciones se corrigieron teniendo en cuenta el efecto de la dilución.

La capacidad de capturar sendos radicales se expresó como porcentaje de actividad antirradicalaria (%AAR) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%AAR = 100\ (1 - Ass/A^{o})_{(1)}$$

Donde A^{o} es el valor de absorbancia de la solución a tiempo cero, antes de la adición del antioxidante. A_{SS} es el valor de la absorbancia en el estado estacionario. Para estimar la A_{SS} se realizó un ajuste de las curvas cinéticas de decoloración mediante el programa OriginPro 6 (OriginLab Corporation).
Se estimaron, además, los valores de EC50 (concentración efectiva de antioxidante o extracto de producto natural, para reducir la concentración inicial del radical al 50%). Para el ensayos de DPPH• se utilizaron, como antioxidantes de referencia, el AG y el AA (ácido ascórbico). Para el radical catión ABTS•+ se utilizó el Trolox como compuesto de referencia.

Ensayo asociado a la peroxidación de lípidos

- **Método de decoloración del *β*-caroteno**

Este ensayo se realizó en base al método modificado por Chaillou y Nazareno (2006), donde la iniciación de la peroxidación lipídica es inducida enzimáticamente mediante el agregado de lipoxigenasa de soja (LOX).
La solución buffer (pH 9) se preparó por dilución de borato de sodio en agua destilada. La solución de ácido linoleico (Fluka) consistió en una mezcla de 20 µL de ácido linoleico con 200 µL de Tween 20 que luego se disolvió en 25 mL del buffer pH 9. Se preparó una emulsión de *β*-caroteno (Sigma-Aldrich) disuelto en el buffer, utilizando Tween 20. La solución de LOX (Sigma-Aldrich), se preparó disolviendo unos 10 mg de la enzima en 25 mL de agua destilada.

Medición del control

En la cubeta de 3 mL se mezclan 2.5 mL de solución de *β*-caroteno con 200 µL de solución de ácido linoleico. Luego se agregó, 200 µL de solución de la enzima LOX para iniciar la reacción, la cual fue monitoreada midiendo absorbancia a 460 nm en ciclos de 30 s durante 10 min.

Medición de la muestra

Se procede de manera similar. Antes de agregar la alícuota de LOX se agregó entre 20 y 100 µL del extracto de la muestra y se completó a 3 mL con buffer de pH 9. Al agregar la enzima, se registró la decoloración del *β*-caroteno a lo largo de 10 min. Los ensayos se realizaron por triplicado a 25ºC. La actividad antioxidante (%AAO) se calculó como el porcentaje de inhibición de la decoloración de *β*-caroteno en las muestras comparado con el control (Burda y Oleszeck, 2001).

$$\%AAO = 100\ [1 - (A_s^{o} - A_s)/(A_c^{o} - A_c)_{(2)}$$

Donde A_s^{o} y A_c^{o} son las absorbancias de la muestra y del control a tiempo cero, respectivamente; mientras A_s y A_c son las absorbancias de la muestra y del control en el estado estacionario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra de ají (*C. frutescens*) seco y molido presentó un contenido de capsaicinoides totales de 10,0 ±0,4 g/kg, equivalente a 150.000 HSU. La extracción con acetona a partir de esta muestra condujo a una ORP-p con un contenido de capsaicinoides de 37,9 ± 5,2 g/kg (568.000 HSU). Esto es, 3,8 veces más pungente que el ají de partida. Se determinó la concentración de los capsaicinoides principales responsables de la pungencia mediante cromatografía HPLC-DAD (**Figura 2**).

	Capsaicinoides Totales (g/kg)	C (g/kg)	DHC (g/kg)
Ají INTA	10,0 ±0,4	5,9 ±0,3	3,8 ±0,1
ORP-p	37,9 ±0,2	24 ±3	14,4 ±2
ORP-np	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 1. Contenido de capsaicinoides totales, Capsaicina (C) y Dihidrocapsaicina (DHC). (n.d.= no

detectable).

Se observa (**Tabla 1**) que se reproduce la proporción entre C y DHC en las muestras pungentes con la del patrón de capsaicinas naturales (65% de C y 35% de DHC). La ORP-np no presentó capsaicinas a niveles detectables por HPLC-DAD.

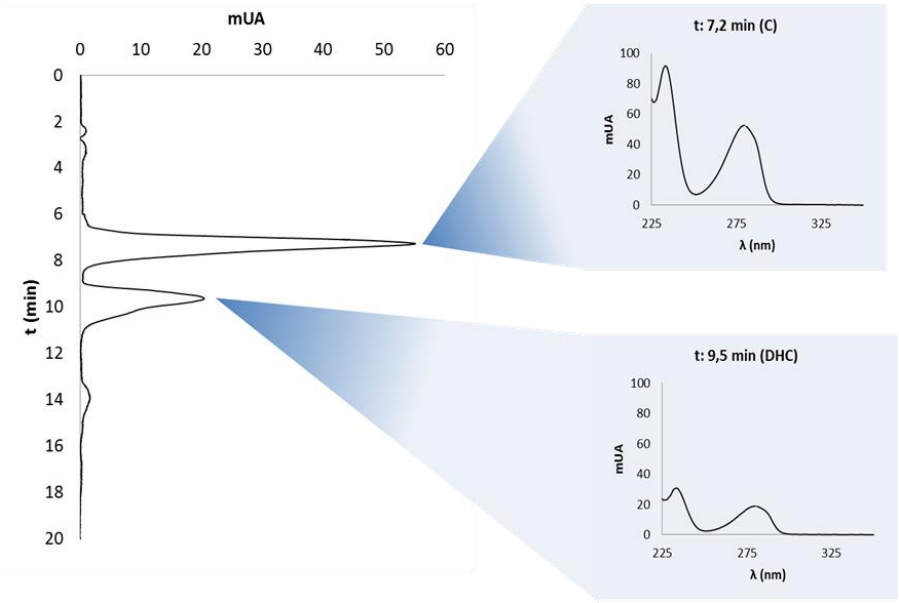


Figura 2. Cromatograma HPLC-DAD de una solución patrón de capsaicinas naturales (detección a 280 nm). Los espectros de los picos principales corresponden a la Capsaicina (C) y la Dihidrocapsaicina (DHC).

Análisis de fenoles totales y poder reductor del ión férrico

Los ensayos de F-C y FRAP muestran la capacidad reductora de los derivados fenólicos existentes. A partir de ensayos comparativos sobre soluciones de AG y de capsaicinas naturales se determinó un factor de equivalencia de 2,9 mg de capsaicinas/mg de AG (**Figura 3-a**). Esto muestra que las capsaicinas presentan un tercio, aproximadamente, de la capacidad antioxidante del AG frente al ensayo de F-C. A partir de esta equivalencia, se determinó la contribución de las capsaicinas al contenido de fenoles totales en cada una de las muestras tanto de ají y como de ORP-p. Así, en la Figura 3-b se observa que, mientras en el ají de partida las capsaicinas representan el 74% de los equivalentes de AG, en la ORP-p los compuestos fenólicos extraídos están asociados exclusivamente a la presencia de capsaicinas. Como se esperaba, esta ORP-p presenta un valor superior de fenoles totales con respecto al ají de partida dada su mayor concentración de capsaicinoides (**Tabla 1**).

En cuanto a la ORP-np, ésta también presentó actividad antioxidante, pese a no poseer capsaicinoides (**Tabla 1**). En estas muestras la actividad antioxidantes es atribuible a la presencia tanto de tocoferoles como de diversos flavonoides, tales como quercetina, luteolina y apigenina (Wahyuni et al. 2011). Así, fue posible determinar que, mientras en las muestras de capasaicinas puras la actividad antioxidante es atribuible exclusivamente a la presencia de este tipo de compuestos, la contribución de otros antioxidantes es del 100% en la ORP-np y del 26% en las muestras de ají (**Figura 3-c**).

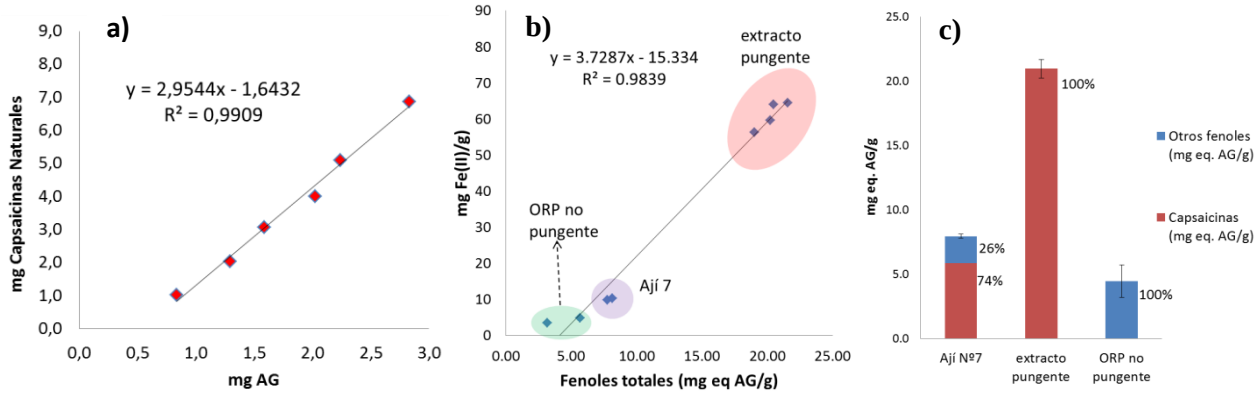


Figura 3. a) Correlación entre capsaicinas naturales (Sigma-Aldrich) y ácido gálico (AG). b) Poder reductor del ión férrico de las muestras en función del contenido de fenoles totales. c) Contribución del contenido de capsaicinas al valor de Fenoles totales (mg eq. AG/g).

Por otra parte, mediante el método FRAP se evaluó la capacidad de las muestras para reducir el Fe (III) a Fe (II). En la **Figura 3-b** se observa una correlación lineal entre la concentración de fenoles provenientes de la capsaicinas (expresada en equivalentes de AG) y su capacidad reductora. Así, es posible concluir que, si bien en las muestras de ORP-np por el ensayo de F-C, se determinó la existencia de otros reductores fenólicos distintos a las capsaicinas, éstos presentan una capacidad reductora de iones Fe(III) despreciable; siendo las capasaicinas las principales responsables de esta actividad.

Análisis de la Actividad Antirradicalaria de capsaicinas puras

Por lo general los compuestos con capacidad reductora, también ejercen una acción antioxidante de captura de radicales libres por donación de átomos de H. La capacidad de captura de los radicales DPPH• o el ABTS•+ por parte de capsaicinas puras se comparó con la de antioxidantes de referencia (AA, AG y TROLOX).

Entre ellos, el ensayo de DPPH• permite entender cómo es el mecanismo de captura de radicales libres y su relación con la estructura del antioxidante. De los ensayos realizados (**Figura 4**), se observa que las capsaicinas son menos efectivas que los antioxidantes AA y AG. Esto surge de comparar los respectivos EC50. Así, el AA presenta un EC50 de 24 µM, el AG de 9 µM, mientras que el EC50 de las capsaicinas puras se eleva a 95 µM (**Figura 4**).

Se calculó el EC50 y el número de moles de DPPH• reducidos por mol de antioxidante (n); siendo n= 1/(2xEC50) (Brand-Williams et al., 1995). Estos valores de EC50 y n son relaciones molares entre el radical y el antioxidante y proveen información acerca del mecanismo de captura del radical.

La evolución de las diferentes cinéticas de reacción depende de la estructura química del antioxidante. Los compuestos que rápidamente reaccionan con el DPPH•, tienen un valor de n relacionado con el número de H disponibles (Brand-Williams et al., 1995). Así, una molécula de AA con n=1,85 reduce aproximadamente 2 moléculas de DPPH• (**Figura 5-a**). Por su parte, el AG presenta una cinética hiperbólica lenta pero muy eficiente (n= 6,25) en virtud de su estructura trifenólica. Su eficiencia se debe a la estabilización del radical AG• que forma un enlace puente hidrógeno intramolecular y a la regeneración de una segunda molécula de AG (**Figura 5-b**).

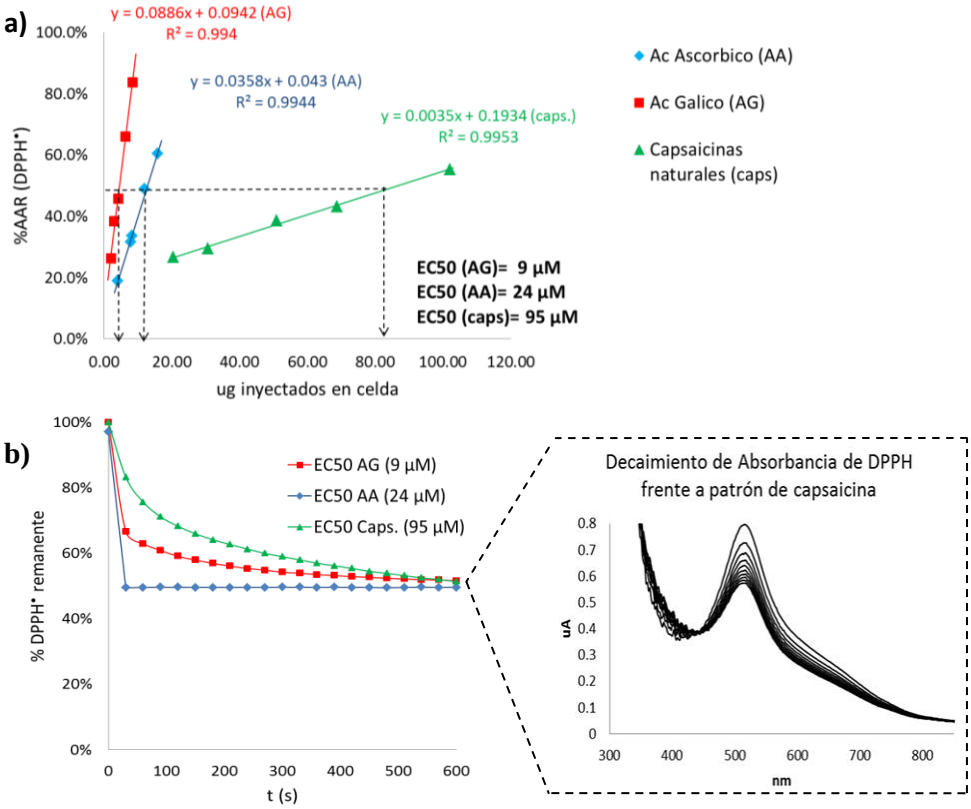


Figura 4. Método de decoloración del DPPH•. a) Curvas de calibración de los antioxidantes AA (ácido ascórbico) AG (ácido gálico) y capsaicinas naturales (caps). b) Curvas de decoloración del DPPH• frente los antioxidantes testeados. Se expresa el EC50 en términos de concentración µM final.

Los valores de n y EC50 determinados para el AA y AG son consistentes con los reportados en bibliografía (**Tabla 2**). Las pequeñas diferencias son atribuibles a las condiciones experimentales en cada caso.
Las capsaicinas naturales, en cambio, presentaron una cinética de reacción mucho más lenta y poco clara. De la comparación con datos de bibliografía, se desprende que las capsaicinas ejercen una acción antirradicalaria mayor que la del ácido vanílico, pero menor que la del guaiacol. La diferencia entre estas tres estructuras se encuentra en la naturaleza del sustituyente en posición para respecto del hidroxilo (Brand-Williams et al. 1995).
En el caso de las capsaicinas, existen pocas referencias acerca del mecanismo de reacción y de su cinética cuando actúan como antioxidantes. Recientemente, se ha planteado la discusión sobre los posibles sitios reactivos de las capsaicinas frente a los radicales libres (**Figura 5-c**). Mientras Nakamura et al. (2002) descartan que el -OH fenólico sea el sitio reactivo de las capsaicinas; proponiendo, en cambio, al H del C-7, Okada et al. (2010), sostienen que es el –OH fenólico el principal responsable de la captura de radicales peroxilos. Finalmente Galano y Martínez (2012), sostienen que el sitio de reacción y la reactividad de la capsaicina no son siempre los mismos, sino que dependen de la naturaleza del radical y de la polaridad del medio.

AO	n= moles DPPH• consumidos/ mol de AO		EC50 [AO (mol/L) /DPPH• (mol/L)]	
	experimental	Bibliografía*	experimental	Bibliografía*
AA	1,74 ± 0,07	1,85[a]	0,30	0,27[a]
AG	4,55 ± 0,40	6,25[a]	0,11	0,08[a]
Capsaicinas	0,42	2,0[b]	1,19	0,25[b]
Naturales		2,0[c]		0,25[c]
guaiacol		2,0 [a]		0,25 [a]
Ácido vanílico		<1 [a]		5,9 [a]

Estructuras

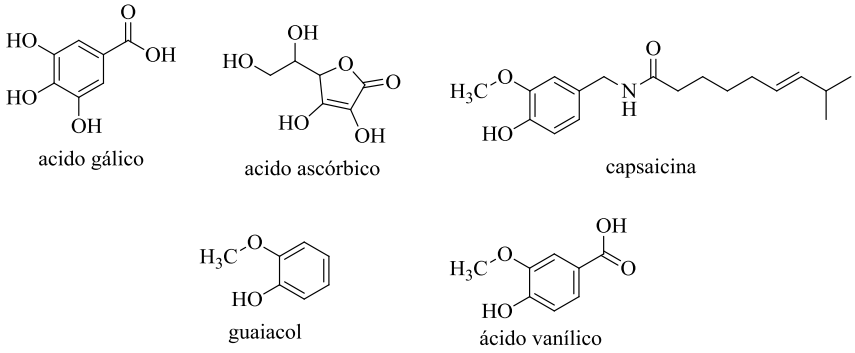


Tabla 2. Valores de n y EC50 para los compuestos puros AA: ácido ascórbico, AG: ácido gálico y capsaicinas naturales. *[a](Brand-Williams et al. 1995); [b y c](Okada et al. 2010).

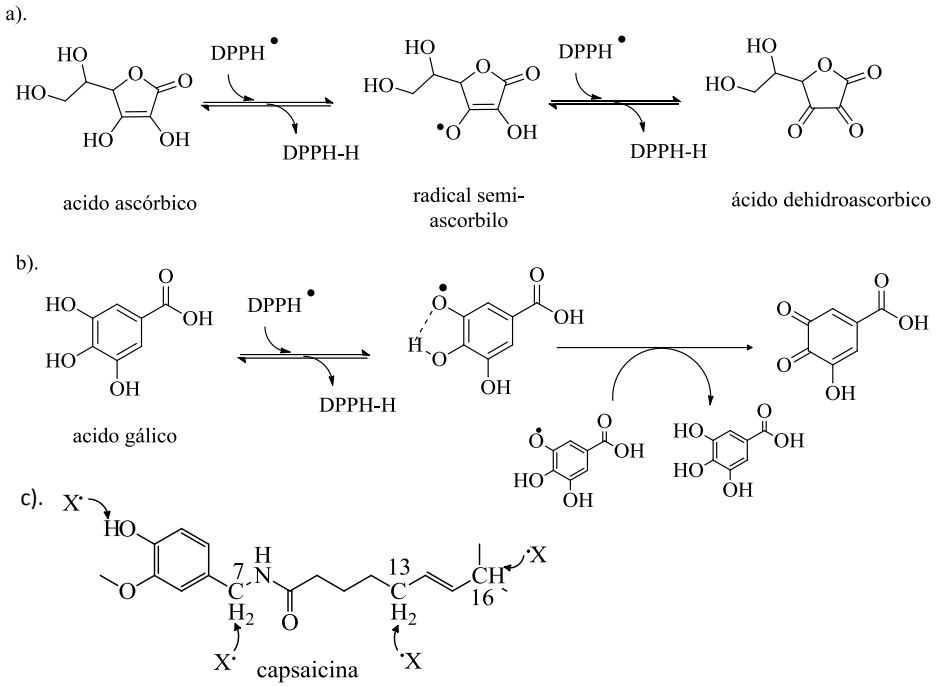


Figura 5. Reacción de AA (a) y AG (b) con el radical DPPH•. c) Potenciales sitios de reacción de captura de radicales de la capsaicina.

Las capsaicinas también presentaron una actividad antirradicalaria frente al radical catión ABTS•+ comparable a la del Trolox, análogo soluble en agua del α-tocoferol. De la comparación de sus valores de EC50, se puede decir que son más efectivas que el Trolox (**Figura 6**). En concordancia, Okada et al. (2010) reportaron que la capsaicina inhibe la lipoperoxidación de una forma más eficiente que el α-tocoferol. La mayor eficiencia de la capsaicina es consecuencia de la formación de un radical más estable que el Trolox luego de la donación del H al presentar una función metoxi (-O-CH_3) en posición orto- que estabiliza al radical formado.

En el ensayo de ABTS•+ se determinó un EC50 de 0,19 para las capsaicinas mientras que el ensayo con Trolox se obtuvo un EC50 de 0,39. Esto demuestra que las capsaicinas, aunque presentan una acción antirradicalaria lenta, capturan al radical catión de una forma más eficiente.

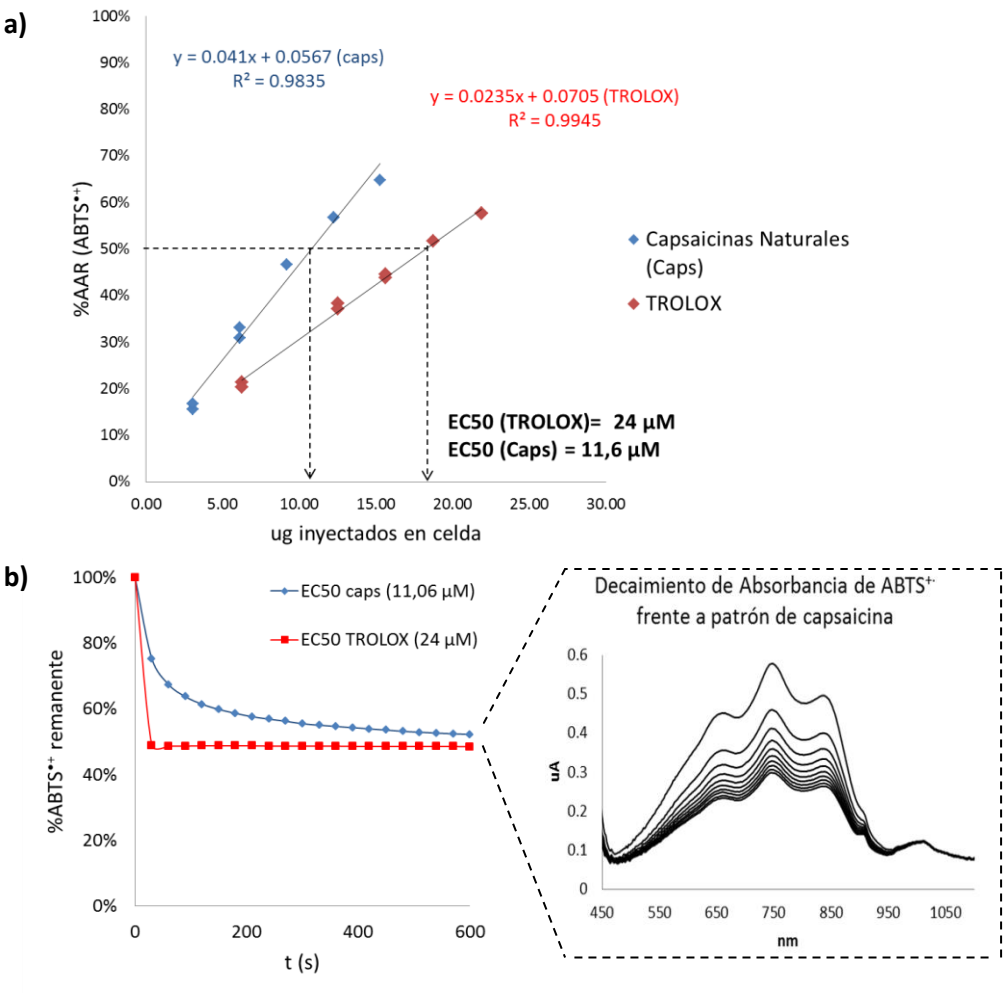


Figura 6. Método de decoloración del ABTS•+. a) Curvas de calibración de los antioxidantes Trolox y patrón de capsaicinas naturales. b) Curvas de decoloración del $ABTS^{\bullet+}$ frente a Trolox y capsaicinas naturales. EC50 se expresa en términos de concentración µM final.

Análisis de la actividad antirradicalaria sobre muestras de *Capsicum*

Tanto la muestra de ají molido como su extracto presentaron actividad antirradicalaria. La ORP-p, con mayor concentración de capsaicinoides, presentó una mayor %AAR por unidad de masa que el ají molido de partida. En cuanto a la ORP-np la acción antirradicalaria observada se atribuye a la presencia de otros fenoles y de carotenoides (**Figura 7**).

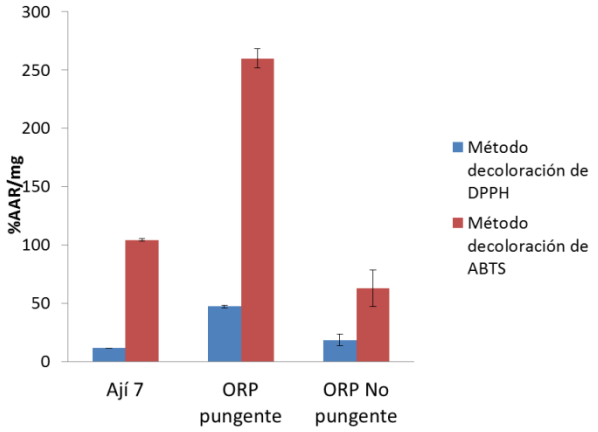


Figura 7. Actividad antirradicalaria por mg de muestra frente a los radicales DPPH• y ABTS•+.

En la **Figura 8-a** se compara el %AAR de las capsaicinas puras con los determinados sobre las muestras, en función del contenido de fenoles totales (□g AG). Considerando el contenido de capsaicinoides totales presente en las muestras, fue posible determinar la existencia de un efecto sinérgico de la matriz que surge de comparar los valores de %AAR de las muestras pungentes con el %AAR que correspondería a la misma cantidad de capsaicinas puras. En la **Figura 8-b**, se muestra cómo, frente el ensayo de decoloración del DPPH, los valores de %AAR de las muestras son mayores a los predichos por el ajuste de la curva del patrón de capsaicinas puras.

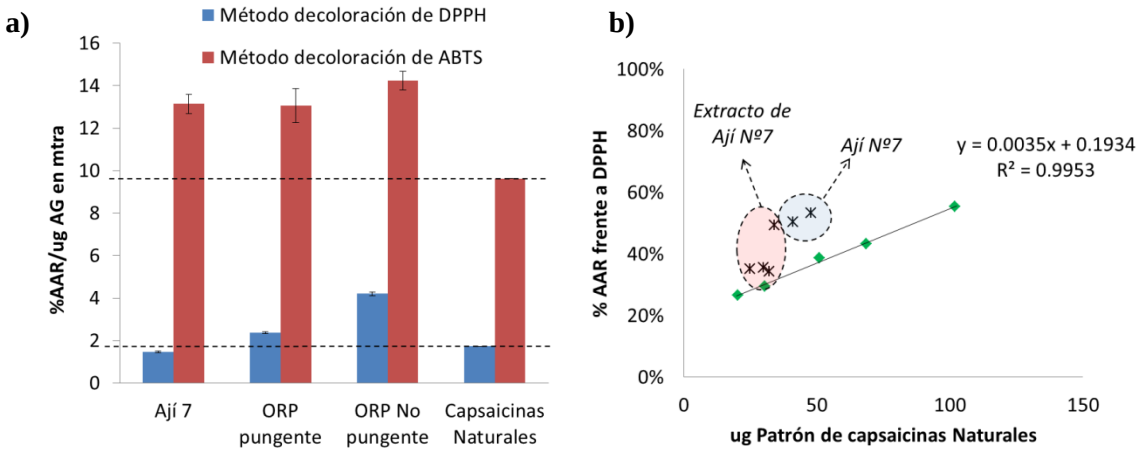


Figura 8. Efecto sinergista de la matriz de las muestras en la acción antirradicalaria frente al DPPH•. a) Valores de %AAR en función del contenido de fenoles totales. b) Valores de %AAR de las muestras pungentes frente al DPPH• comparado con el de las soluciones de capsaicinas puras.)

Actividad antioxidante evaluada por el método de blanqueamiento del β-caroteno

Este método evalúa la Actividad Antioxidante (AAO), entendida como la capacidad de minimizar la oxidación del β-caroteno. Se utiliza un sustrato lipídico modelo, bajo la forma de una emulsión, reproduciendo de una manera cercana a los sistemas biológicos. La tendencia general es que aquellos compuestos con buena actividad antirradicalaria también poseen buena actividad antioxidante; aunque existen compuestos que no siguen esta tendencia y su capacidad antioxidante se explica en términos de

actividad inhibitoria de la enzima LOX (Chaillou y Nazareno, 2006).
Este ensayo implica el seguimiento del decaimiento de la absorbancia consecuencia de la degradación del *β*-caroteno emulsionado. Debido a la presencia de carotenoides no fue posible realizar esta experiencia sobre las muestras coloreadas de ají y oleorresinas pues estos interfieren en la medición de la absorbancia además de competir con la actividad del *β*-caroteno.
Se evaluó entonces sólo el comportamiento antioxidante del patrón de capsaicinas puras. De los espectros obtenidos del sistema, tanto en presencia como en ausencia de capsaicinas, se observó que las mismas imparten una acción antioxidante que protege al *β*-caroteno de la degradación. Sin embargo, las capsaicinas presentan una banda en la zona del UV a 230 nm, que interfiere en el monitoreo cualitativo de la formación de los dienos conjugados generados por acción de la LOX (**Figura 9**).

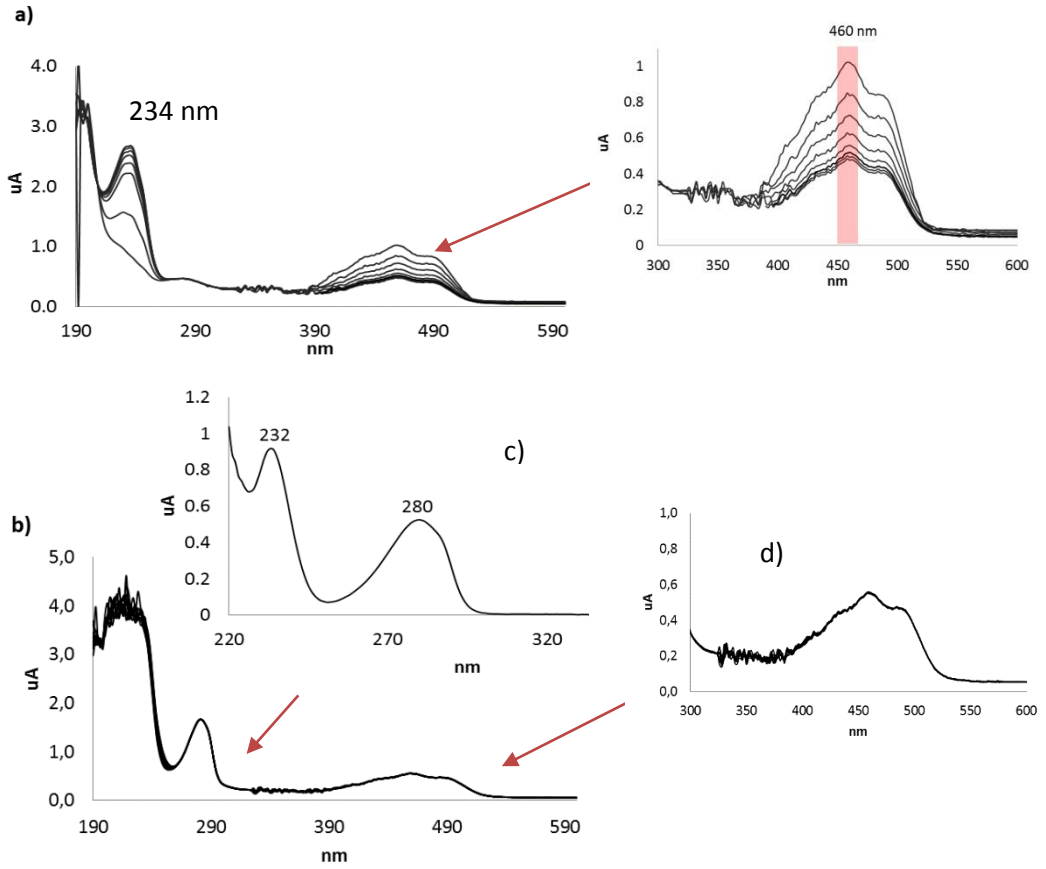


Figura 9. Evolución de la co-oxidación del β-caroteno y ácido linoleico a) en ausencia de capsaicinas. b) en presencia de capsaicinas puras. Se muestra el espectro de capsaicinas naturales puras en etanol c) y el espectro en la región de absorbancia del β-caroteno d).

No se observaron modificaciones importantes en la AAO con el aumento de la concentración de capsaicinas (**Figura 10-a**). Este comportamiento puede atribuirse al hecho que, para que un antioxidante pueda actuar en la protección del β-caroteno, se debe distribuir homogéneamente en la fase lipofílica (Chaillou y Nazareno, 2006). En las condiciones básicas del ensayo (pH=9) es de esperarse que las capsaicinas se encuentren bajo su forma aniónica. Así, en el interior de las micelas, las capsaicinas tenderían a orientarse con la cabeza polar dirigida hacia la interfase y con la cola apolar hacia dentro de la micela, concentrándose en la interfase sin distribuirse homogéneamente en su interior. De esta manera, las variaciones en el agregado de capasaicinas

sólo provocarían pequeños cambios de concentración en el interior de la micela; no respondiendo su acción antioxidante al incremento de concentración. A diferencia de la acción observada sobre las capsaicinas, las soluciones de Trolox, sí mostraron una dependencia de la protección del β-caroteno con la concentración (**Figura 10- b**).

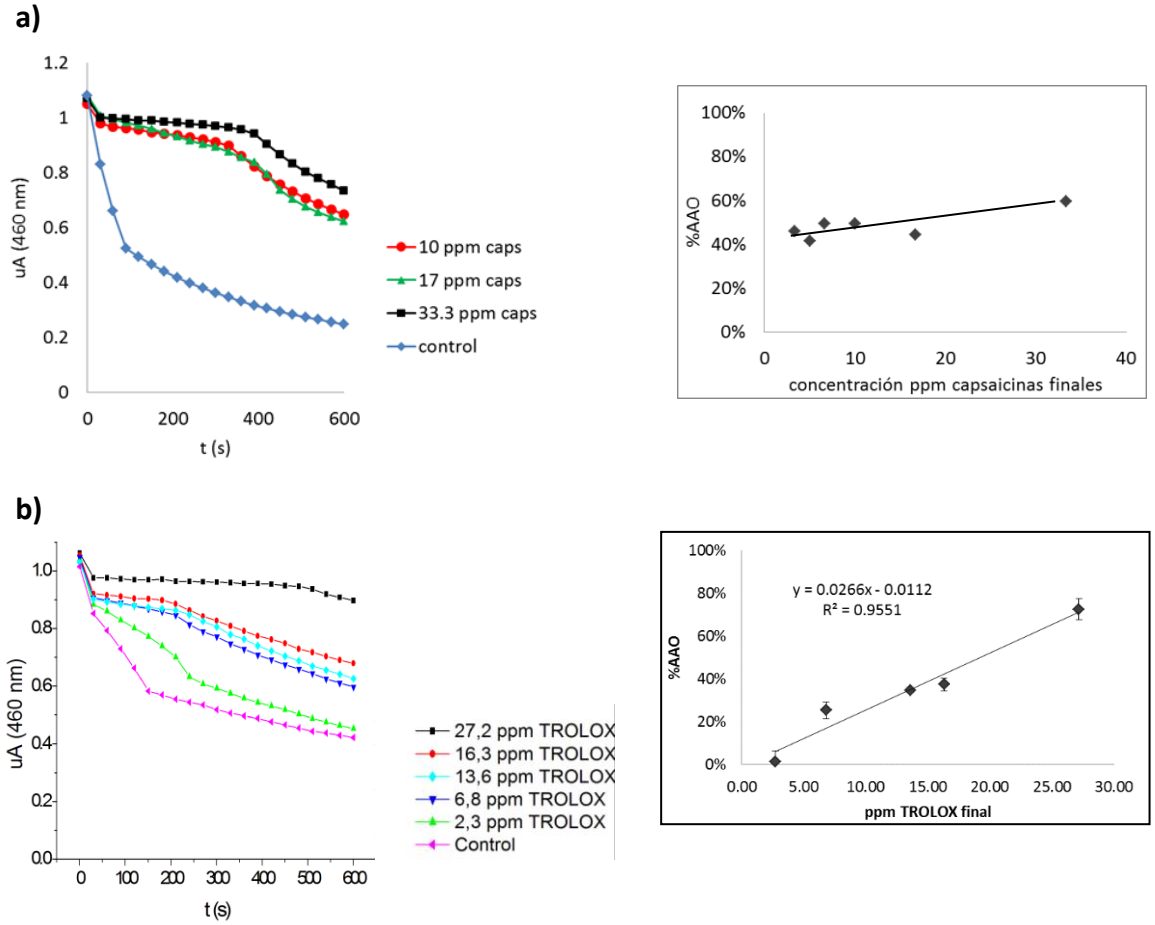


Figura 10 a). Curvas de decoloración de β-caroteno en presencia de distintas concentraciones de Trolox b) %AAO en función de la concentración final de patrón Trolox.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una buena correlación entre las capsaicinas naturales y el contenido fenólico expresado como AG, lo que permitió determinar la contribución de las capsaicinas a los fenoles totales. Así, en el ají de partida las capsaicinas representan el 74% de los fenoles totales; mientras que en la ORP-p los compuestos fenólicos presentes corresponden en un 100% a capsaicinas. La ORP-np, presentan otros compuestos fenólicos distintos a las capsaicinas capaces de reducir al reactivo de F-C pero que no presentaron capacidad reductora del ión Fe(III).

Las capsaicinas puras mostraron acción antirradicalaria moderada de cinética lenta, determinada por el método de DPPH• ; aunque fueron menos efectivas que los antioxidantes utilizados como referencia (AA y AG). Frente al ABTS•+ las capsaicinas capturan al radical-catión de una forma más eficiente que Trolox.

En las muestras pungentes existe un efecto sinérgico de la matriz en la actividad antirradicalaria.

Si bien, el patrón de capsaicinas puras imparte una acción antioxidante protectora del β-caroteno frente al

ataque de radicales peroxilos, no muestra una dependencia importante con la concentración. Esto se atribuyó a la complejidad de los procesos en la interfase lípido: agua del sistema micelar.

BIBLIOGRAFÍA

Berker K I, Güçlü K, Tor I, Apak R. 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. Talanta, 72(3): 1157–1165.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, 28(1): 25–30.

Burda S, y Oleszek W. 2001. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6): 2774–2779.

Chaillou, LL, Nazareno, MA. 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(22): 8397–8402.

Galano A, Martínez A. 2012. Capsaicin, a tasty free radical scavenger: Mechanism of action and kinetics. Journal of Physical Chemistry B, 116(3): 1200–1208.

Henderson DE, Henderson SK. 1992. Thermal Decomposition of Capsaicin , 1 , Interactions with Oleic Acid at High Temperatures.

Henderson DE, Slickman AM, Henderson SK. 1999. Quantitative HPLC Determination of the Antioxidant Activity of Capsaicin on the Formation of Lipid Hydroperoxides of Linoleic Acid : A Comparative Study against BHT and Melatonin.

Ito N, Fukushima S, Hasagawa A, Shibata M, Ogiso T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. Journal of National Cancer Institute, 70: 343–347.

Kumaran A, Karunakaran RJ. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. LWT - Food Science and Technology, 40(2): 344–352.

Murakami K, Ito M, Htay HH, Tsubouchi R, Yoshino M. 2001. Antioxidant Effect of Capsaicinoids on the Metal-catalyzed Lipid Peroxidation. Biochemical Research, 22(1): 15–17.

Nakamura T, Ooi T., Kogure K, Nishimura M, Terada H, Kusumi T. 2002. Structures of the radical (DPPH) oxidation products of dihydrocapsaicin. Tetrahedron Letters, 43(45): 8181–8183.

Nazareno MA, Chaillo LL, González EA. 2011. New insights of natural antioxidants in foods, 661(2): 91–112.

Okada Y, Okajima H, Shima Y, Ohta H. 2002. Hydroxyl radical scavenging action of capsaicin. Redox Report : Communications in Free Radical Research, 7(3): 153–7.

Okada Y, Tanaka K, Sato E, Okajima H. 2010. Kinetics and antioxidative sites of capsaicin in homogeneous solution. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 87(12): 1397–1405.

Osuna-García JA, Wall, MM, Wadell CA. 1998. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of New Mexican-type chile (Capsicum annuum L.) cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 5093–5096.

Perucka I, Materska M. 2005. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (Capsicum annuum L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1750–1756.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26(98): 1231–1237.

Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG. 2011. Metabolite biodiversity in pepper (Capsicum) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. Phytochemistry, 72: 1358–1370.

Efecto de humectantes dulces sobre las características reologicas de sistemas que simulan salsas ácidas.

Zalazar A.L.[1,2], Gliemmo M. F.[1,2], Campos C. A.[1,2]

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias, Buenos Aires, Argentina.
(2) CONICET, Buenos Aires, Argentina.
aldizalazar@hotmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de glucosa y xilitol sobre las características reológicas de sistemas modelo acuosos y de emulsiones con distintos niveles de goma xántica a pH 3,50, a fin de simular salsas ácidas. Los sistemas se formularon en caldo Sabouraud y se agregó xilitol o glucosa en cantidad suficiente para alcanzar una actividad de agua de 0,980. En el caso de las emulsiones, se adicionó, aceite de maíz y se realizó la emulsificación con un homogeneizador de alta velocidad. Para evaluar el comportamiento viscoelástico se realizaron mediciones en un reómetro dinámico de tensión tangencial controlada, trabajándose con una geometría de cono y plato. Se realizaron barridos de esfuerzo y de frecuencia para obtener el espectro mecánico de cada sistema. A partir de ello, se evaluó la dependencia del módulo elástico (G'), del módulo viscoso (G") y de la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ) de cada muestra con la frecuencia. Además, se evaluó el umbral de fluencia (σ) mediante el método del cruce de tangentes. Los dos solutos afectaron las características reológicas de los sistemas estudiados así como también el contenido de aceite y el nivel de goma xántica.

Palabras Clave: xilitol, glucosa, goma xántica, propiedades reológicas, salsas ácidas.

ABSTRACT

In this work the effect of glucose and xylitol on the rheological characteristics of aqueous model systems and emulsions at pH 3.50 was studied, and its relation with xanthan gum content in order to model acid sauces. The systems were formulated in Sabouraud broth and xylitol or glucose were added to achieve a water activity of 0.980. For the emulsions corn oil was added and the emulsification was performed with a high speed homogenizer. The viscoelastic behavior was evaluated with a controlled-stress rheometer provided with a cone and-plate geometry. Strain and frequency sweeps were performed to obain the mechanical spectrum of each system. Therefore, the frequency dependence and magnitude of the storage modulus G' and the loss modulus G'' and the tangent of the phase angle (tan δ) were evaluated. Furthermore, the yield stress (σ) of the samples was determined by using the tangent crossover method. The two solutes affected the rheological characteristics of the studied systems and this effect depended on the presence of oil and the level of xanthan gum.

Key words (¿)

INTRODUCCION

En las últimas décadas se ha incrementado la importancia nutritiva y económica de los aderezos para ensaladas (Sikora et al. 2008), los cuales se utilizan con frecuencia para mejorar el atractivo y el sabor de los alimentos. Desde el punto de vista reológico, un aderezo para ensalada es un fluido pseudoplástico con umbral de fluencia. Las propiedades reológicas de los aderezos influyen en su calidad, atributos sensoriales,

vida útil, y su microestructura (Ma et al. 2013). Para lograr la estabilidad de dichos productos durante su almacenamiento se utilizan generalmente diferentes hidrocoloides, incluyendo goma xántica, goma guar, goma carragenano, goma de algarrobo, goma árabiga, pectinas y alginato de propilenglicol (Paraskevopoulou et al. 2007), los cuales, tienen la capacidad de hidratarse y formar dispersiones viscosas y/o geles cuando se mezclan con agua, modificando la reología de los sistemas alimentarios. Uno de los hidrocoloides más estudiados, debido a sus propiedades reológicas y fisicoquímicas, es la goma xántica (Rodd et al. 2000), la cual está formada por una cadena principal de unidades de β-(1,4)-D-glucosa y otra lateral, compuesta por un trisacárido con dos moléculas de manosa y una de ácido glucurónico (Nussinovitch 1997). Las cadenas laterales se unen a la columna vertebral helicoidal estabilizando la estructura (Moorhouse et al. 1977) y otorgándole rigidez a la molécula, que resulta en una excelente estabilidad al calor y a los ácidos y álcalis. Como la viscosidad de sus soluciones cambia muy poco con la temperatura, la hace irreemplazable en el espesamiento y estabilización de los aderezos para ensalada, que deben fluir fácilmente apenas retirados de la heladera o que no deben espesarse demasiado por enfriamiento ni volverse demasiado líquidos al calentarse. En salsas para ensalada, además de espesante, la goma xántica actua como estabilizante de la emulsión de aceite en agua. Iguales funciones desempeña en los aderezos bajos en calorías (BeMiller y Whistler 2010).

Uno de los factores de estrés empleados para prevenir la proliferación microbiana en aderezos para ensalada es la disminución de la actividad de agua, a_w (Smittle y Cirigliano, 1994). Generalmente, para lograr esta condición se agregan distintos humectantes, como glucosa y xilitol, los cuales, además de disminuir la a_w, pueden modificar la estructura deseada y la estabilidad de dichos aderezos. El xilitol es un poliol, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration) como aditivo alimentario directo para usar en alimentos. Tiene el mismo dulzor y cuerpo que la sacarosa pero aporta un tercio menos de calorías. Además de actuar como humectante, al reducir la a_w, mejora la textura y la sensación en la boca (O'Brien Nabors 2002).

El comportamiento reológico y el estudio de las interacciones entre los hidrocoloides y otros componentes, como los humectantes, en formulaciones de alimentos, se investigan para conocer su microestructura y caracterizar a los productos. Los ensayos reológicos son útiles para estudiar la organización estructural interna y las interacciones entre los componentes dentro de los sistemas dispersos y las emulsiones. Una prueba de flujo en estado estacionario, proporciona información acerca de las interacciones entre las gotas de una emulsión. Los experimentos oscilatorios de pequeña amplitud, llevados a cabo dentro de la región viscoelástica lineal, minimizan el daño ocacionado a la muestra durante las mediciones. Este enfoque permite el estudio de la viscoelasticidad de los sistemas complejos que pueden estar relacionados con sus características estructurales (Ma et al. 2013).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la presencia de dos humectantes (glucosa y xilitol), el aceite y diferentes niveles de goma xántica sobre las propiedades reológicas de sistemas que modelan salsas ácidas de pH 3,50.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El medio utilizado para la preparación de los sistemas fue caldo Sabouraud (Biokar, Francia). La goma xántica, xilitol (Cargill, Argentina), glucosa (Dextrosa Anhidra, Anedra, Canada) y el aceite de maíz fueron de grado alimentario. El ácido cítrico fue de grado analítico (Anedra, Canada).

Preparación de los sistemas modelo

Se formularon sistemas modelo en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de goma xántica, xilitol, glucosa y aceite de maíz como se muestra en la Tabla 1, por pesada directa de los distintos ingredientes para obtener 200,0 g de cada sistema. Para poder comparar los sistemas acuosos con los emulsionados, la concentración de goma xántica, xilitol y glucosa en los sistemas acuosos (A, B, E, F, I, J) fue igual a la de las fases acuosas de los sistemas emulsionados (C, D, G, H, K, L). La concentración de glucosa y xilitol fue la

necesaria para lograr una actividad de agua de 0,980 en todos los sistemas elaborados. La a_w se midió a 25°C con un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Pullman, W.A., Estados Unidos). El error en la determinación de la a_w fue de 0,002 unidades de a_w. Todos los ingredientes, a excepción del aceite, se suspendieron en agua destilada y se colocaron en frascos de vidrio de base circular. La goma xántica se dispersó en forma de lluvia y se dejó en agitación 24 horas a temperatura ambiente para su hidratación. Los sistemas así constituidos fueron esterilizados en autoclave a 100°C durante 30 minutos. El pH fue ajustado a 3,50 por agregado aséptico de una solución de ácido cítrico (25% m/v), y se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro (Fisher, USA). Para la elaboración de las emulsiones, se agregó la cantidad correspondiente de aceite en condiciones de esterilidad y se realizó la emulsificación con un homogeneizador de alta velocidad (Ultra turrax, IKA, Alemania) durante 1 minuto a 13500 rpm, para formar la emulsión, seguido de 3 minutos a 24000 rpm para reducir el tamaño de gota. El nivel mínimo de goma xántica fue elegido teniendo en cuenta la cantidad necesaria para mantener estable la emulsión en el transcurso del ensayo. Todos los sistemas se almacenaron a 25ºC por 1 día para su estabilización.

Tabla 1. Composición de los sistemas modelo estudiados

Sistemas	**Goma xántica** (% m/m)	**Xilitol** (% m/m)	**Glucosa** (% m/m)	**Aceite de maíz** (% m/m)	**Aw**
A	0,448	0,00	0,00	0,0	0,997
B	1,818	0,00	0,00	0,0	0,994
C	0,250 (0,448)*	0,00	0,00	44,0	0,997
D	1,000 (1,818)*	0,00	0,00	44,0	0,993
E	0,448	14,65	0,00	0,0	0,982
F	1,818	14,65	0,00	0,0	0,979
G	0,250 (0,448)*	8,17 (14,65)*	0,00	44,0	0,981
H	1,000 (1,818)*	8,06 (14,65)*	0,00	44,0	0,980
I	0,448	0,00	17,28	0,0	0,981
J	1,818	0,00	17,28	0,0	0,979
K	0,250 (0,448)*	0,00	9,65 (17,28)*	44,0	0,980
L	1,000 (1,818)*	0,00	9,50 (17,28)*	44,0	0,978

*entre paréntesis se indica la concentración en fase acuosa para su comparación.

Mediciones reológicas

Para evaluar el comportamiento viscoelástico de los sistemas se realizaron mediciones en un reómetro dinámico de tensión tangencial controlada (Paar Physica MCR 300, Antón Paar GmbH, Alemania) con una geometría de cono (24,94 mm de diámetro, ángulo de 2º) y plato (sensor CP25-2) con un espacio o *gap* entre ellos de 1 mm. Se colocaron aproximadamente 0,5 ml de muestra entre cono y plato, lo que permitió llenar completamente el espacio entre ellos. Cada muestra se colocó sobre la platina apoyándose, a continuación, el cono sobre la misma según se fijaba desde el sofware del equipo. Durante el proceso de medición, cada muestra debió alcanzar un estado de verdadero o pseudo equilibrio. Por lo tanto, para evitar su deshidratación durante la medición, se la aisló y se la mantuvo en una atmósfera húmeda mediante el uso de un anillo de acrílico, provisto de una tapa metálica perforada para permitir la permanencia del sensor. La plataforma (fija) donde se apoya la muestra a medir posee un controlador de temperatura por sistema Peltier (TEK 150P-CF), conectado a un baño termostático (Viscotherm VT2, Physica, Germany). Todas las mediciones fueron hechas a 25ºC. Se realizaron barridos de esfuerzo entre 0,01 y 200 Pa a frecuencias constantes de 6 s^{-1} para determinar el rango de viscoelasticidad lineal. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó un valor de deformación para cada muestra y se realizaron los barridos de frecuencia en el rango de 0,1 a 100 s^{-1} para obtener el espectro mecánico de cada sistema. A partir de ello, se evaluó la

dependencia del módulo elástico (G'), del módulo viscoso (G") y de la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ) de cada muestra con la frecuencia. Por otra parte, se evaluó la presencia de un umbral de fluencia (σ) mediante el método del cruce de tangentes (Mertens y et al. 2009). En este método se determina el umbral de fluencia como el valor del esfuerzo de corte en el que termina el comportamiento de deformación elástica reversible y comienza el comportamiento de deformación irreversible. La primera tangente se ajusta en el intervalo de bajos esfuerzos de corte, donde es válida la ley de Hooke. La segunda tangente se ajusta en el intervalo de altos esfuerzos de corte, donde fluye la muestra. Esta última tiene una pendiente mayor en comparación con la primera. La intersección de ambas tangentes determina el valor del esfuerzo de corte, que se toma como el umbral de fluencia (σ). En este estudio, las mediciones del umbral de fluencia se realizaron mediante el aumento de la tensión de corte de 0 Pa a 150 Pa, dependiendo de la muestra en estudio, con un intervalo de tiempo de 60 s entre cada punto de medición.

Análisis de datos

Los parámetros reológicos informados corresponden al promedio de dos determinaciones realizadas sobre muestras preparadas de forma independiente. La existencia de diferencias significativas entre los parámetros se evaluó mediante un ANOVA y el test de Tukey empleando el programa Statgraphics (Statgraphics Plus para Windows, versión 5.0, 2001, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA). La significatividad estadística se evaluó al nivel del 5 % ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

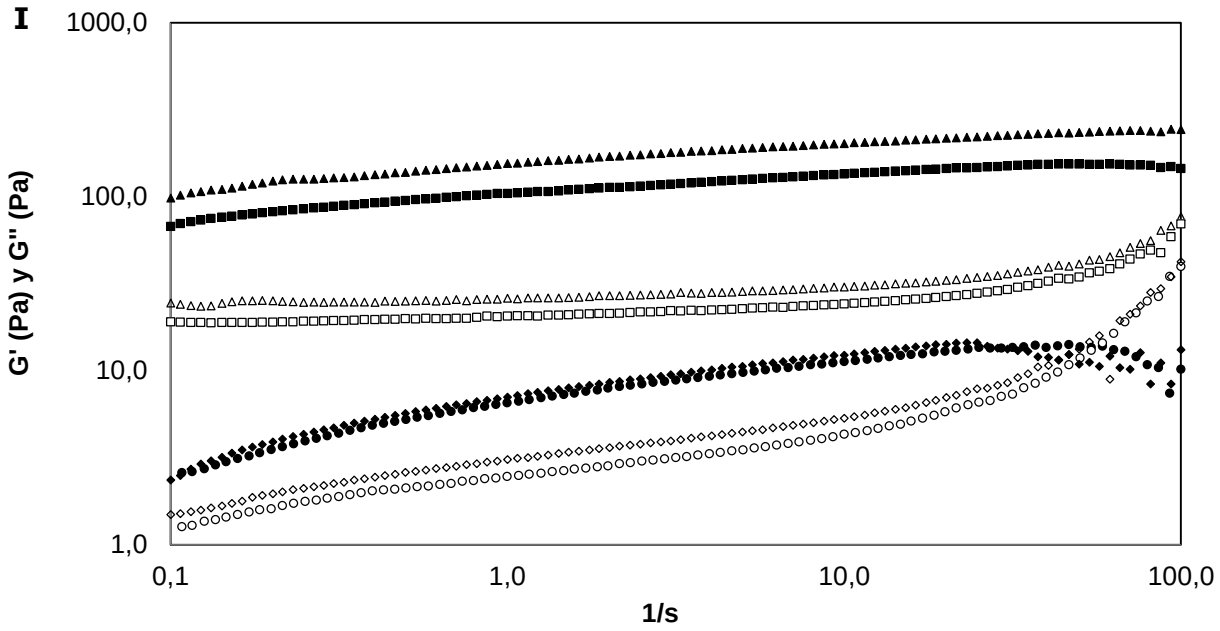
Las **Figuras 1** y **2** presentan los espectros mecánicos de todos los sistemas analizados, obtenidos por barrido de frecuencia de 0,1 a 100 s^{-1}. Los sistemas acuosos que contienen 0,448% de goma xántica (sistemas A, E, I) y las emulsiones con 44,0% de aceite con igual contenido de goma xántica en la fase acuosa (sistemas C, G, K) mostraron un comportamiento similar al de un gel débil donde G' predominó sobre G" en casi todo el rango de frecuencias. Además, estos sistemas presentaron un cruce a altas frecuencias (57,0-75,0 s^{-1}). Estos resultados concuerdan con lo ya informado en bibliografía sobre el comportamiento de las dispersiones de goma xántica como gel débil, el cual, se caracteriza por presentar una red similar a un gel frágil que se rompe fácilmente cuando se somete a una tensión lo suficientemente alta (Rao y Steffe 1992). Cabe destacar que este comportamiento fue independiente de la presencia y de la naturaleza del humectante.

En los sistemas acuosos que contienen 1,818% de goma xántica, el nivel más alto estudiado (sistemas B, F, J) y las emulsiones con 44,00% de aceite con igual contenido de goma xántica en la fase acuosa (sistemas D, H, L) se pudo ver un comportamiento que se aproxima al de un gel fuerte, en el cual G' depende levemente de la frecuencia, y se produce una mayor diferencia entre G' y G'', sin llegar a ser un gel fuerte ya que para ello tan δ debe ser menor a 0,1 (Da Silva y Rao 1992). Esta tendencia está relacionada con una movilidad macromolecular baja y fue independiente de la presencia y de la naturaleza del humectante.

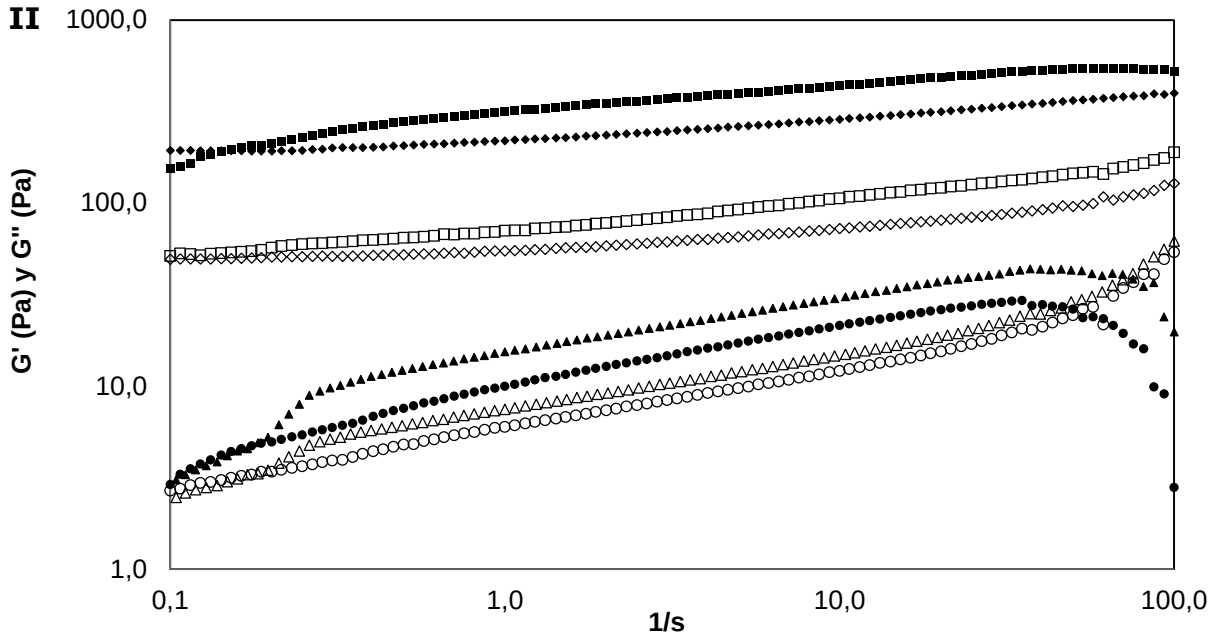
La **Tabla 2** muestra los parámetros reológicos de los sistemas estudiados: módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G"), tangente del ángulo de desfase δ (tan δ = G" / G') a una frecuencia de 0,1 s^{-1} y el umbral de fluencia (σ). El incremento de goma xántica aumentó σ, G' y G'' y disminuyó tan δ. Esta tendencia era la esperada, ya que, a mayor concentración de macromoléculas, el sistema se estructura.

En la Figura 1 se muestran los espectros mecánicos de los sistemas con xilitol y sus controles sin depresor. En fase acuosa y en presencia de xilitol aumentó el comportamiento viscoso y disminuyó el comportamiento elástico en los sistemas con mayor contenido de xántica, ya que, G' y G'' disminuyeron en todo el rango de frecuencias (**Figura 1**, Panel I, sistema A vs E y B vs F), pero el comportamiento fue el opuesto en las emulsiones, donde G' y G'' aumentaron en casi todo el rango de frecuencias, independientemente del nivel de goma xántica, y además, el cruce entre G' y G'', se corrió hacia mayores frecuencias (de 43,3 a 73,1 s^{-1}), (**Figura 1**, Panel II, sistema C vs G y D vs H). Al agregar xilitol a las fases acuosas con menor nivel de xántica no se observan diferencias significativas en los parámetros reológicos medidos a una frecuencia de 0,1 s^{-1} (**Figura 1**, Panel I, sistema A vs E), pero en las fases acuosas con mayor nivel de xántica G' y G'' disminuyeron significativamente, como se observa en el espectro mecánico (sistema B vs F, **Tabla 2**, **Figura**

1, Panel I). A pesar de que en los espectros mecánicos se observó que el xilitol estructuraba las emulsiones, σ disminuyó significativamente en la emulsión con menor nivel de xántica (**Tabla 2**, sistema C vs G), pero aumentó en la emulsión con mayor nivel de xántica (sistema D vs H, **Tabla 2**, **Figura 1**, Panel II). Por lo tanto, el efecto del xilitol dependió de la presencia de aceite y del nivel de goma xántica, dado que, a mayor nivel de xántica disminuyó el comportamiento elástico de la fase acuosa con (sistema B vs F), pero se estructuró más la emulsión (sistema D vs H). En trabajos previos, donde se analizaron soluciones con distintas concentraciones de goma guar y polioles, se observó que el incremento de la concentración de xilitol, aumentó los valores de G', dando como resultado sistemas más estructurados. Además, el xilitol disminuyó los valores de tan δ en comparación con los valores obtenidos con la goma pura, lo que sugiere un aumento en la elasticidad del sistema volviéndose más cercano al de un gel (Moser et al. 2013). Sin embargo, Kommineni et al. (2012) reportaron que la adición de xilitol al queso procesado bajo en grasa disminuyó G' y G'', lo que puede ser el resultado de una lubricación dentro de la matriz de proteína causada por el xilitol. Igualmente, Torres et al. (2013) informaron que el xilitol produjo un debilitamiento significativo de los geles preparados con mezclas de harinas de castaña y arroz disminuyendo G' y G''.

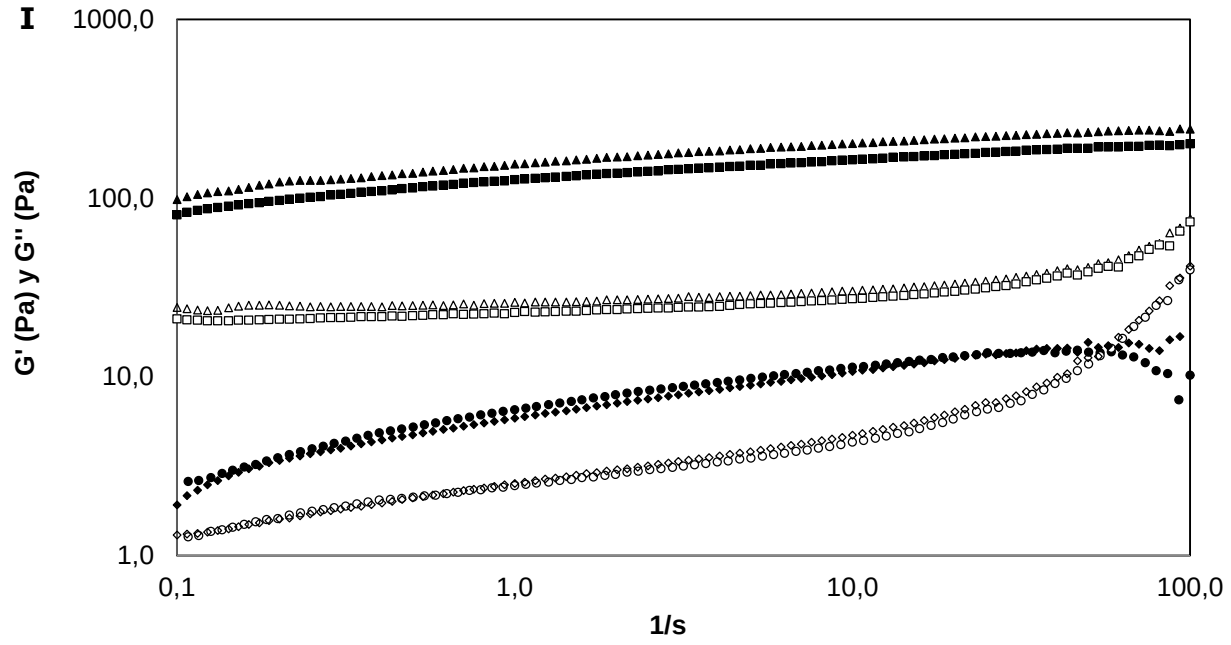


Sistema A (0,448% goma xántica): (●) G', (○) G''. Sistema B (1,818% goma xántica): (▲) G', (△) G''. Sistema E (0,448% goma xántica/14,65% xilitol): (◆) G', (◇) G''. Sistema F (1,818% goma xántica/14,65% xilitol): (■) G', (□) G''.

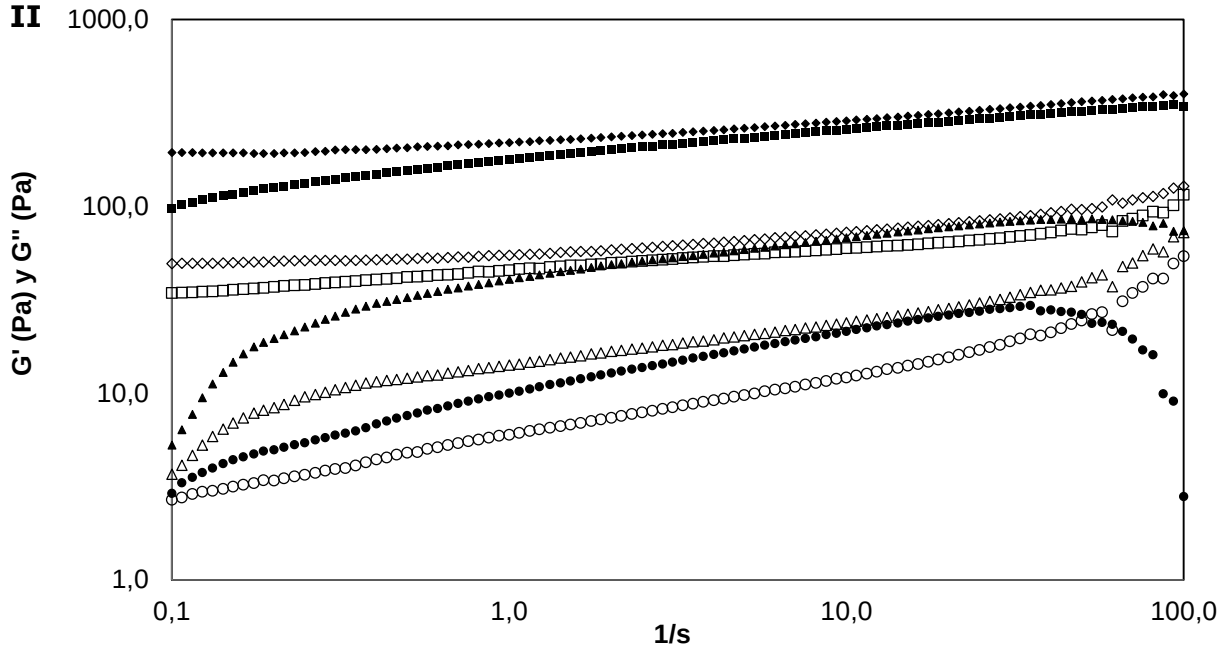


Sistema C (0,250% goma xántica/44,0% aceite): (●) G', (○) G''. Sistema D (1,000% goma xántica/44,00% aceite): (◆) G', (◇) G''. Sistema G (0,250% goma xántica/44,0% aceite/8,17% xilitol): (▲) G', (△) G''. Sistema H (1,000% goma xántica/44,00% aceite/8,06% xilitol): (■) G', (□) G''.

Figura 1. Espectros mecánicos de los sistemas estudiados obtenidos con un barrido de frecuencias de 0,1 a 100 s^{-1} a 25ºC. Panel I: sistemas acuosos con xilitol y sus controles sin xilitol. Panel II: emulsiones con xilitol y sus controles sin xilitol.



Sistema A (0,448% goma xántica): (●) G', (○) G''. Sistema B (1,818% goma xántica): (▲) G', (△) G''. Sistema I (0,448% goma xántica/17,28% glucosa): (◆) G', (◇) G''. Sistema J (1,818% goma xántica/17,28% glucosa): (■) G', (□) G''.



Sistema C (0,250% goma xántica/44,0% aceite): (●) G', (○) G''. Sistema D (1,000% goma xántica/44,00% aceite): (◆) G', (◇) G''. Sistema K (0,250% goma xántica/44,0% aceite/9,65% glucosa): (▲) G', (△) G''. Sistema L (1,000% goma xántica/44,00% aceite/9,50% glucosa): (■) G', (□) G''.

Figura 2. Espectros mecánicos de los sistemas estudiados obtenidos con un barrido de frecuencias de 0,1 a 100 s^{-1} a 25ºC. Panel I: sistemas acuosos con glucosa y sus controles sin glucosa. Panel II: emulsiones con glucosa y sus controles sin glucosa.

Tabla 2. Parámetros reológicos de los sistemas estudiados (Grupo I: sistemas con menor nivel de goma xántica; Grupo II: sistemas con mayor nivel de xántica): módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G''), tangente del ángulo de desfase δ (tan δ = G'' / G') a 0,1 s^{-1} y 25ºC; y umbral de fluencia (σ) determinado por el método del cruce de tangentes a 25°C.

Grupo I	**G' (Pa)**	**G'' (Pa)**	**tan δ**	**σ (Pa)**
A	2,26 ± 0,03 a	1,34 ± 0,16 a	0,61 ± 0,16 a	3,31 ± 0,66 ab
C	2,90 ± 0,26 a	2,68 ± 0,15 b	0,93 ± 0,02 b	4,50 ± 0,32 b
E	2,71 ± 0,50 a	1,56 ± 0,09 a	0,58 ± 0,07 a	3,38 ± 0,28 ab
G	2,82 ± 0,02 a	2,47 ± 0,06 b	0,88 ± 0,01 ab	2,51 ± 0,33 a
I	1,98 ± 0,08 a	1,32 ± 0,02 a	0,67 ± 0,02 ab	3,21 ± 0,15 ab
K	5,37 ± 0,13 b	3,66 ± 0,02 c	0,68 ± 0,02 ab	4,21 ± 0,01 b

Grupo II	**G'(Pa)**	**G''(Pa)**	**tan δ**	**σ (Pa)**
B	100,20 ± 2,55 a	24,00 ± 0,71 a	0,24 ± 0,01 a	44,71 ± 3,31 a

D	190,00 ± 5,65 b	48,90 ± 0,56 b	0,26 ± 0,01 a	57,76 ± 1,85 b
F	66,75 ± 1,06 c	19,10 ± 0,01 c	0,29 ± 0,01 b	38,01 ± 1,06 a
H	156,00 ± 1,41 d	51,35 ± 0,07 b	0,33 ± 0,03 c	65,17 ± 0,31 c
J	76,85 ± 5,02 c	20,25 ± 1,20 c	0,26 ± 0,01 a	41,29 ± 1,46 a
L	98,70 ± 1,70 a	34,85 ± 0,78 d	0,35 ± 0,01 c	39, 27 ± 1,72 a

El error corresponde a la desviación estándar. Dentro de cada columna, los valores señalados con la misma letra no presentan diferencias significativas (P< 0,05).

Con respecto al agregado de glucosa, a partir de los espectros mecánicos se puede observar que la adición de este humectante en fase acuosa, disminuyó levemente G' en todo el rango, reduciendo el comportamiento elástico (**Figura 2**, Panel I, sistema A vs I y B vs J). El mismo comportamiento se observó en la emulsión para el sistema con mayor nivel de xántica, pero se obtuvo un resultado opuesto para el de menor nivel de xántica (**Figura 2**, Panel II, sistemas C vs K y D vs L). Además el cruce de los módulos se corrió a mayores frecuencias (de 57,2 a 100,0 s^{-1}), indicando que el sistema se estructuró. Al agregar glucosa a las fases acuosas con menor nivel de xántica no se observaron diferencias significativas en los parámetros reológicos (sistema A vs I, **Tabla 2**), pero en aquellas con mayor nivel de xántica disminuyeron significativamente G' y G'', aunque no se vieron diferencias en tan δ ni en σ (sistema B vs J, **Tabla 2**, **Figura 2**, Panel I). Al agregar glucosa a la emulsión con menor nivel de xántica se estructuró el sistema, ya que, aumentaron significativamente G' y G'', disminuyó tan δ y el σ no se modificó (sistema C vs K), pero en la emulsión con mayor nivel de xántica (sistema D vs L), disminuyeron significativamente G', G'' y σ, aumentando tan δ (**Tabla 2**, **Figura 2**, Panel II). Por lo tanto, el efecto de la glucosa también dependió de la presencia de aceite y del nivel de goma xántica, ya que, disminuyó el comportamiento elástico de la fase acuosa y de la emulsión con mayor nivel de xántica (sistemas J y L), pero aumentó el comportamiento elástico de la emulsión con menor contenido de goma xántica (sistema C vs K). Como ya se mencionó anteriormente, el aumento de goma xántica estructura la emulsión sin depresor aumentando G', pero este aumento se ve atenuado al agregar glucosa, lo que sugiere la existencia de una interacción entre goma xántica y glucosa (**Figura 3**). La glucosa tiene hidratación positiva en su relación con el agua y se acomoda bien en la estructura tetraédrica de dicho solvente debido a su anillo piranósico (Taylor y Rowlinson 1955). Por lo tanto, el aumento de la concentración de glucosa en el medio acuoso disminuiría aún más la movilidad del agua. Sin embargo, este comportamiento no llegó a afectar los parámetros reológicos de los sistemas con goma xántica.

Los dos depresores de la a_w analizados aumentaron G' y G'' en las emulsiones con el menor nivel de xántica (sistema C vs G y K), pero solo el xilitol aumentó también G' de la emulsión con mayor nivel de xántica (sistema D vs H) en casi todo el rango de frecuencias estudiado, la glucosa, por el contrario disminuyo G' y G'' (sistema D vs L). En las fases acuosas de los sistemas con mayor contenido de goma xántica se observó que, tanto el xilitol como la glucosa, disminuyeron G' y G'' en todo el rango de frecuencias analizado.

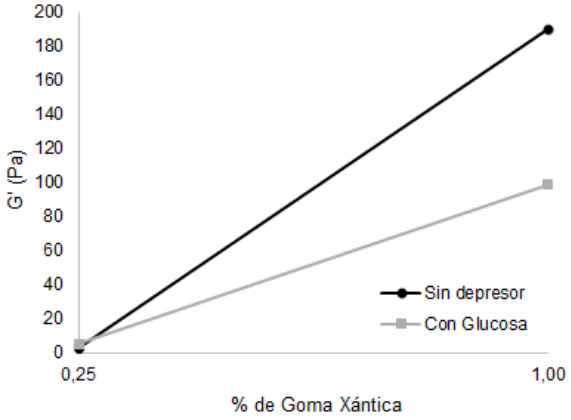


Figura 3. Efecto de la glucosa y la goma xántica en el módulo de almacenamiento (G'), a 0,1s^{-1} de frecuencia a 25ºC.

CONCLUSIONES

La presencia de los humectantes utilizados en este trabajo afectaron las características reológicas de los sistemas estudiados y este efecto dependió de la presencia de aceite y del nivel de goma xántica. Sin embargo, la cantidad de goma xántica y la presencia de aceite fueron los factores que más influyeron sobre los parámetros reológicos, lo que se pudo evidenciar en los distintos espectros mecánicos obtenidos y en las diferencias en los valores de los módulos de almacenamiento y de pérdida, tangente del ángulo de desfase y umbrales de fluencia. El incremento de la concentración de goma xántica promovió un aumento en el comportamiento elástico de los sistemas, efecto atribuido a su capacidad estructurante. Por otra parte, el agregado de 44,0% m/m de aceite aumentó el comportamiento elástico de los sistemas. Este efecto se vincularía con la formación de una gran cantidad de gotas en la emulsión y, en consecuencia, con el empaquetamiento del sistema.

BIBLIOGRAFIA

BeMiller J y Whistler RL. 2010. Carbohidratos. En: Fennema OR, editores. Química de los alimentos. 3°ra. Zaragoza: Acribia, S.A. pag 248-253.

Da Silva, JAL, & Rao MA. 1992. Viscoelastic properties of foods hydrocolloids dispersions. En: Rao MA, Steffe, JF, editores. Viscoelastic properties of foods. London: Elsevier Applied Science. pag 285-316.

Kommineni A, Amamcharla J, Metzge LE. 2012. Effect of xylitol on the functional properties of low-fat process cheese, Journal of Dairy Science, 95: 6252-6259.

Ma Z, Boye JI, Fortin J, Simpson BK, Prasher SO. 2013. Rheological, physical stability, microstructural and sensory properties of salad dressings supplemented with raw and thermally treated lentil flours. Journal of Food Engineering, 116: 862–872.

Mertens L, Geeraerd AH, Dang TDT, Vermeulen A, Serneels K, Van Derlinden E, Cappuyns AM, Moldenaers P, Debevere J, Devlieghere F, Van Impe JF. 2009. Design of an experimental viscoelastic food model system for studying *Zygosaccharomyces bailii* spoilage in acidic sauces. Applied and Environmental Microbiology, 75: 7060-7069.

Moorhouse R, Walkinshaw MD, Arnott S. 1977. Xanthan gum molecular conformation and interactions. En Sandfold PA y Laskin A, editors. Extracellular microbial polysaccharides. Washington, DC: American Chemical Society. pag 90–102.

Moser P, Lopes Cornelio M, Nicoletti Telis VN. 2013. Influence of the concentration of polyols on the rheological and spectral characteristics of guar gum. Food Science and Technology, 53: 29-36

Nussinovitch, A. 1997. Hydrocolloid applications: Gum technology in the food and other industries. London: Blackie Academic & Professional, pag 156–158.

O'Brien Nabors L. 2002. Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. Food technology, 56: 28–34, 45.

Paraskevopoulou D, Boskou D, Paraskevopoulou A. 2007. Oxidative stability of olive oil–lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides. Food Chemistry, 101: 1197–1204.

Rao MA, Steffe JF. 1992. Viscoelastic properties of foods. Elsevier Applied Science. Londres, Inglaterra.

Rodd AB, Dunstan DE, Boger DV. 2000. Characterization of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. Carbohydrate Polymers, 42: 159–174.

Sikora M, Badrie N, Deisingh AK, Kowalski S. 2008. Sauces and dressings: a review of properties and applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48: 50–77.

Smittle RB y Cirigliano MC. 1994. Salad Dressings. Cáp. 53. En: Vanderzant C y Splittstoesser DF, editores.

Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3°ed., New York, Estados Unidos.
Taylor JB, Rowlinson JS. 1955. The Thermodynamic Properties of Aqueous Solutions of Glucose. J. Trans. Faraday SOC, 51: 1183-1192.
Torres M.D., Raymundo A. y Sousac I. (2013). Effect of sucrose, stevia and xylitol on rheological properties of gels from blends of chestnut and rice flours. *Carbohydrate Polymers*, 98, 249–256

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

Efecto de humectantes y de la presencia de *Zygosaccharomyces bailii* sobre la estabilidad física de emulsiones aceite en agua

Zalazar A.L.[1,2], Gliemmo M.F.[1,2], Campos C.A.[1,2]

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias, Buenos Aires, Argentina.
(2) CONICET, Buenos Aires, Argentina.
aldizalazar@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de distintos humectantes y de la inoculación con *Zygosaccharomyces bailii* sobre la estabilidad de emulsiones ácidas. Para tal fin, se formularon sistemas en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de goma xántica (GX), y se agregó NaCl, xilitol o glucosa en cantidad suficiente para bajar la actividad de agua a 0,980. Luego, se adicionó 44,00% m/m de aceite de maíz y se emulsificaron. Parte de los sistemas se inocularon con 10^4 UFC/g de *Z. bailii*. Todas las emulsiones se almacenaron a 25ºC por 7 días. Para evaluar la estabilidad física se determinó el diámetro de Sauter ($D_{3,2}$) el diámetro de Broucker ($D_{4,3}$) y el potencial zeta en los sistemas inoculados y sin inocular al tiempo inicial y después de 7 días. Los resultados obtenidos indican que los factores estudiados afectaron significativamente la estabilidad física de emulsiones ácidas y esta tendencia debe considerarse en la selección del humectante a usar.

Palabras Clave: emulsiones, goma xántica, NaCl, glucosa, xilitol.

ABSTRACT

The present work deals with the evaluation of the effect of different humectants and the inoculation with *Zygosaccharomyces bailii* on the stability of acid emulsions. For that purpose, systems containing Sabouraud broth and different concentrations of xantham gum and NaCl, xylitol or glucose at the concentration needed to achieve a water activity of 0.980= were prepared. Then, 44.00% w/w corn oil was added and the systems were emulsified. Half of the systems were inoculated with *Z. bailii* (10^4 CFU/g). All the emulsions were stored at 25ºC for 7 days. The physical stability was evaluated through the evaluation of Sauter diameter ($D_{3,2}$), Broucker ($D_{4,3}$) diameter and zeta potential in systems at the initial time inoculated and uninoculated at zero time and after 7 days. The results show that the studied factors significantly affect the physical stability of acid emulsions and this trend should be considered in the selection of humectant to use.

Keywords: emulsions, xanthan gum, NaCl, glucose, xylitol.

INTRODUCCION

Las emulsiones aceite en agua son la base de muchos alimentos, entre los cuales se pueden citar: mayonesa, aderezos para ensaladas, leche y helados. Debido a la importancia de estos productos, las emulsiones representan un área de gran relevancia dentro de la industria alimentaria (Sikora et al. 2008). Los constituyentes de una emulsión interactúan entre sí, ya sea física o químicamente, para determinar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto final. La producción de alimentos emulsionados de alta calidad dependerá entonces del conocimiento del efecto que cada constituyente produzca sobre las propiedades generales del producto y de cómo esta contribución se ve influenciada por la presencia de otros constituyentes (McClements 1999).

Los alimentos emulsionados presentan problemas de calidad en relación a la estabilidad de la emulsión, al deterioro del flavor debido a la oxidación e hidrólisis de los lípidos y al crecimiento microbiano (Smittle y Flowers 1982). La estabilidad física de una emulsión está condicionada por el resultado de un balance complejo de fuerzas de atracción y repulsión entre las gotas de la fase dispersa, limitado por las condiciones fisicoquímicas del medio continuo (Evans y Wennerström 1994). Con el objetivo de mejorar la estabilidad se agregan estabilizantes como la goma xántica, la cual, es un heteropolisacárido soluble en agua fría y en soluciones ácidas.

Por otra parte, uno de los factores de estrés empleados para prevenir el deterioro microbiano es la depresión de la actividad de agua (a_w) por agregado de solutos. Los más usados son NaCl, glucosa y sacarosa, pero también se utiliza cloruro de potasio y polioles, entre ellos xilitol (Pszczola 2001, Gliemmo et al. 2010). Aunque la mayoría de las levaduras crecen fácilmente en presencia de 20% m/m de glucosa, solamente un limitado número de estas son capaces de crecer a baja a_w. De acuerdo con Kurtzman et al. (1971), *Zygosaccharomyces bailii* es la levadura predominante en los productos almacenados que evidencian"off-flavors". En emulsiones, el crecimiento de *Z. bailii* esta influenciado por la cantidad de aceite y la presencia de estabilizantes (Castro et al. 2003). Por otra parte, el desarrollo microbiano puede promover la inestabilidad física de la emulsión debido a la interacción de los microorganismos con las gotas de aceite (Li *et al.* 2001).

En base a lo comentado, el presente estudio está orientado a evaluar el efecto de la presencia de distintos humectantes (NaCl, glucosa y xilitol), aceite y diferentes niveles de GX y de la presencia de *Z. bailii* sobre la estabilidad física de emulsiones ácidas de pH 3,50.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El microorganismo usado fue *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256. Los medios utilizados para el cultivo, la preparación de los sistemas y el recuento microbiano fueron caldo y agar Sabouraud (Biokar, Francia).La goma xántica (GX) (Cargill, Argentina), el xilitol (Cargill, Argentina), la glucosa (Anedra, Canada), el NaCl (Biopack, Argentina) y el ácido cítrico (Anedra, Canada) fueron de grado analítico, mientras que el aceite de maíz fue de grado alimenticio.

Preparación de los sistemas modelo

Se formularon emulsiones en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de GX, NaCl, xilitol, glucosa y aceite de maíz, como se muestra en la **Tabla 1**, por pesada directa de los distintos ingredientes para obtener 200,0 g de cada sistema. La concentración de NaCl, glucosa y xilitol fue la necesaria para lograr una actividad de agua de 0,980 en todos los sistemas. La a_w se midió a 25°C con un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Estados Unidos). Todos los ingredientes, a excepción del aceite, se suspendieron en agua destilada y se colocaron en frascos de vidrio. La GX se dispersó en forma de lluvia y se dejó 24 horas en agitación a 25°C para su hidratación. Los sistemas así constituidos fueron esterilizados en autoclave a 100°C durante 30 minutos y se ajustó el pH a 3,50 por agregado aséptico de ácido cítrico (25% m/v). El pH se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (USA). Para la elaboración de las emulsiones, se agregó la cantidad correspondiente de aceite en condiciones de esterilidad y se realizó la emulsificación con un homogeneizador de alta velocidad (Ultra turrax, IKA, Alemania), durante 1 minuto a 13500 rpm para formar la emulsión y luego 3 minutos a 24000 rpm para reducir el tamaño de gota.

Tabla 1.Concentración de GX, NaCl, xilitol, glucosa y aceite de maíz en los sistemas modelo.

Sistemas	**GX** (%m/m)	**NaCl** (%m/m)	**Xilitol** (%m/m)	**Glucosa** (%m/m)	**Aceite** (%m/m)	**Aw**
A	0,250	0,00	0,00	0,00	44,0	0,979
B	1,000	0,00	0,00	0,00	44,0	0,980

C	0,250	1,67	0,00	0,00	44,0	0,982
D	1,000	1,65	0,00	0,00	44,0	0,980
E	0,250	0,00	8,17	0,00	44,0	0,981
F	1,000	0,00	8,06	0,00	44,0	0,980
G	0,250	0,00	0,00	9,65	44,0	0,980
H	1,000	0,00	0,00	9,50	44,0	0,978

Medición del tamaño de gota

Se tomaron alícuotas de 1,0 ml de las emulsiones sin inocular e inoculadas luego del 1° y 7° día de realizar la emulsión y se determinaron los diámetros promedio y las curvas de distribución de tamaño de partícula por dispersión estática de luz utilizando un Mastersizer 2000 equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000 MU, de Malvern Instruments Ltd. (Reino unido). Los resultados se expresaron como el diámetro promedio de la relación volumen-superficie o diámetro de Sauter ($D_{3,2}=\Sigma\ n_i d^3_i/\Sigma\ n_i d^2_i$) y el diámetro de volumen medio equivalente o diámetro De Brouker ($D_{4,3}=\Sigma n_i d^4_i/\Sigma n_i d^3_i$), donde n_i es el número de gotas de diámetro d_i (Lerouxet al.2003). El parámetro $D_{3,2}$ brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas y $D_{4,3}$ está relacionado con cambios en el tamaño de partícula que involucran procesos de desestabilización (Camino et al. 2009).

Medición del potencial Zeta

Para determinar la carga neta superficial de las partículas en solución, se realizó la medición del potencial zeta (Zp) en un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Inglaterra). Las soluciones se diluyeron al 0,01 y 0,001% p/v con agua bidestilada a pH 3,50 y se colocaron en celdas capilares provistas de electrodos a cada lado. El potencial zeta se determinó midiendo la dirección y velocidad de las partículas al aplicar un campo eléctrico. Se hicieron diez lecturas por muestra y cada medición se repitió en al menos dos muestras preparadas por separado.

Preparación del inóculo, inoculación y almacenamiento

Antes de su uso, *Zygosaccharomyces bailii* fue inoculada en caldo Sabouraud y almacenada a 25,0 ± 0,5ºC durante 24 horas bajo una leve agitación. Luego, se realizó un pasaje del inóculo a caldo Sabouraud fresco y se repitió el procedimiento de incubación. De esta manera se obtuvieron cultivos de levaduras indicadoras con más de 10^8 UFC/ml de caldo. El inóculo obtenido se diluyó en agua de peptona hasta alcanzar una turbidez de 0,5 de la escala McFarland, que corresponde a una población de aproximadamente 10^6 UFC/ml. La turbidez fue medida con un turbidímetro (Densichek Biomerieux, Francia).

Los sistemas modelo fueron inoculados con *Z. bailii*, alcanzando una población inicial de 10^4 UFC/g. Alícuotas de 30g de cada uno de los sistemas inoculados fueron colocados por duplicado en frascos de vidrio estériles los cuales se almacenaron en una cámara de temperatura constante a 25°C ± 1°C por 7 días.

Análisis de datos

Se calculó el promedio de los tamaños de gota y la desviación estándar de 10 lecturas hechas en dos muestras preparadas de forma independiente. Para establecer el efecto de la presencia de los distintos ingredientes sobre el $D_{3,2}$, $D_{4,3}$, y Zp obtenidos se les aplicó un análisis de la varianza (ANOVA). Las comparaciones entre tratamientos se efectuaron utilizando la prueba de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el empleo del programa Statgraphics® (Statgraphics Centurion para Windows 7, 2005, USA). En todos los casos, se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Distribución del tamaño de gota

Las emulsiones alimentarias generalmente son polidispersas (McClements 2007). Es deseable obtener gotas pequeñas y monodispersas de modo de tener una emulsión más estable. La **Figura 1** muestra las distribuciones de tamaño de gota obtenidas. Todas las emulsiones, exceptuando las que contenían NaCl,

presentaron una distribución bimodal. La presencia de xilitol o glucosa no modifico las curvas de distribución de tamaño de gota de las emulsiones en relación al sistema libre de solutos. Los diámetros medios de las emulsiones que contenían NaCl fueron los mayores. Las emulsiones no evidenciaron visualmente cremado y la distribución del tamaño de gota de todos los sistemas se mantuvo estable, no varió con el tiempo ni con la inoculación.

Efecto de los depresores de la actividad de agua y de *Z. bailii* sobre el tamaño de gota de las emulsiones

En la **Tabla 2** se pueden observar los diámetros $D_{3,2}$ y$D_{4,}$ y sus desvíos estándar para las emulsiones inoculadas y sin inocular, medidas al primero y al séptimo día de su preparación.

En las emulsiones sin inocular, sin depresor, el aumento en el nivel de la GX no modificó $D_{3,2}$ y promovió un aumento de $D_{4,3}$ (**Tabla 2**, sistemas A vs. B). Según Parker et al. (1995), la GX estabiliza los aderezos debido a la interacción repulsiva entre las gotitas de emulsión y las moléculas de GX y por la formación de una red débil alrededor de las gotitas que evita la floculación. El uso de 1,000% de GX forma un sistema más viscoso y, como consecuencia, se reduce la eficiencia de la homogeneización, lo que conduce a la formación de gotas con un mayor $D_{4,3}$ (Huang et al. 2001).

El agregado de NaCl, aumentó significativamente el $D_{3,2}$ y el $D_{4,3,}$ pero el efecto fue menor al elevarse la concentración de GX (**Tabla 2**, sistemas A vs. C y B vs. D). La adición de NaCl podría desestabilizar las emulsiones a través de la reducción de la repulsión electrostática entre las gotas. Estos resultados pueden atribuirse a los efectos de apantallamiento electrostático o a la acumulación de iones de carga opuesta (Na^+ o Cl^-) alrededor de las superficies de las gotas (McClements 2004; Klinkesorn y Namatsila 2009). El aumento de la concentración de GX disminuiría este apantallamiento electrostático, lo que estabilizaría la emulsión, disminuyendo el tamaño de gota.

La adición de xilitol produjo una reducción en el $D_{3,2}$ y el $D_{4,3,}$ originando las emulsiones más estables (**Tabla 2**, sistemas A vs. E y B vs. F). La emulsión que contenía mayor cantidad de GX (sistema F) presentó valores significativamente menores de $D_{3,2}$ y el $D_{4,3.}$

Las emulsiones con glucosa (**Tabla 2**, sistemas G y H) no presentaron diferencias significativas entre ellas, pero presentaron valores significativamente menores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ con respecto a los sistemas sin depresores (sistemas A y B) y valores significativamente mayores con respecto a las emulsiones con xilitol (sistemas G y H).

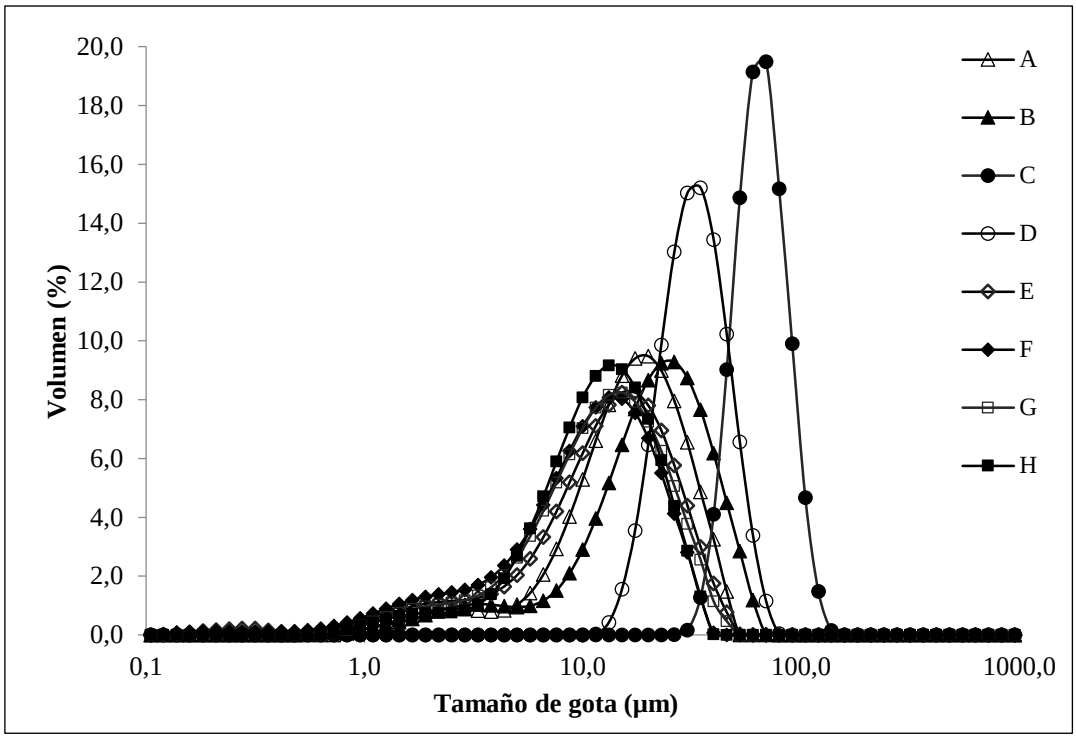


Figura 1. Distribución por volumen del tamaño de gota (□m) de las emulsiones no inoculadas a las 24hs de su preparación.(—△—)A: 0,250% GX/44,0% aceite; (—▲—)B: 1,000% GX/44,0% aceite; (—●—)C: 0,250% GX/1,67% NaCl/44,0% aceite; (—○—)D: 1,000% GX/1,65% NaCl/44,0% aceite; (—◇—)E: 0,250% GX/8,17% xilitol/44,0% aceite; (—◆—)F: 1,000% GX/8,06% xilitol/44,0% aceite; (—□—)G: 0,250% GX/ 9,65% glucosa/44,0% aceite; (—■—)H: 1,000% GX/9,50% glucosa/44,0% aceite.

La inoculación incrementó el $D_{3,2}$ de los sistemas A (0,250% GX y 44,00% aceite) y D (1,000% GX, 1,65% NaCl y 44% aceite). El aumento del tamaño de partícula observado podría ser originado por la desestabilización de las emulsiones causada por el crecimiento de *Z. bailii*. La inoculación también incrementó el $D_{4,3}$ de las emulsiones, exceptuando los sistemas C (0,250% GX, 1,67% NaCl y 44,00% aceite), E (0,250% GX, 8,17% xilitol y 44,00% aceite) y G (0,250% GX, 9,65% glucosa y 44,00% aceite). Según Li et al. (2001), el desarrollo microbiano puede promover la inestabilidad física de la emulsión debido a la interacción de los microorganismos con las gotas de aceite, lo cual se encuentra muy influenciado por la carga superficial del microorganismo y de las gotas de la emulsión. Las bacterias cargadas negativamente promueven la floculación y coalescencia de las emulsiones que contienen gotas cargadas positivamente. Además, la magnitud de la diferencia de carga entre las bacterias y las gotas podría influir en la fuerza de la interacción. Por otra parte, los microorganismos podrían inestabilizar las emulsiones por otros mecanismos, tales como la disminución del pH de la fase continua debido a la formación de productos de fermentación, o por la ruptura de las gotas de la emulsión debido a la utilización de los emulsionantes como nutrientes.
Después de 7 días de almacenamiento, el $D_{3,2}$ no se modificó en los sistemas no inoculados con *Z. bailii*, en cambio, el $D_{4,3}$ aumentó en los sistemas con xilitol (**Tabla 2**, sistemas E y F) y disminuyó en uno de los sistemas con glucosa (sistema H). El parámetro $D_{4,3}$ está relacionado con el volumen ocupado por las partículas y por lo tanto es más sensible a la aglomeración, la desagregación o floculación. Después de 7 días de almacenamiento, en los sistemas inoculados, se observó un aumento del $D_{4,3}$ de las emulsiones F,G y H, lo que indica que las partículas se están agregando, y un aumento del $D_{3,2}$ de los sistemas con glucosa (sistema G y H).

Tabla 2. Diámetros medios de Sauter ($D_{3,2}$), diámetros de Broucker ($D_{4,3}$) y sus desvíos estándar de las emulsiones inoculadas y sin inocular medidas al 1er y al 7mo día de su preparación, almacenadas a 25ºC

Sistemas	**$D_{3,2}$ ± desvío estándar (µm)**			
	No inoculadas		**Inoculadas**	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
A	9.63 ± 0.09 A, a	9.89 ± 0.03 A, a	10.44 ± 0.07 A, b	10.47 ± 0.13 A, b
B	10.13 ± 0.10 A, a	9.45 ± 0.14 AB, a	9.82 ± 0.93 AB, a	10.73 ± 0.01 A, a
C	66,35 ± 0,36 B, a	65,85 ± 0,22 C, a	67,91 ± 0,05 C, a	67,83 ± 1,36 B, a
D	28,29 ± 0,11 C, a	28,73 ± 0,13 D, a	37,41 ± 0,19 D, b	37,75 ± 0,04 C, b
E	6,15 ± 0,02 D, a	6,24 ± 0,05 E, a	6,40 ± 0,23 E, a	6,41 ± 0,13 D, a
F	5,03 ± 0,03 E, a	4,95 ± 0,81 F, a	4,75 ± 0,06 F, a	4,79 ± 0,18 E, a
G	8,32 ± 0,02 F, a	8,71 ± 0,03 B, a	8,25 ± 0,07 G, a	9,44 ± 0,18 A, b
H	8,64 ± 0,12 F, a	8,36 ± 0,15 AB, a	8,65 ± 0,07 BG, a	9,29 ± 0,10 A, b
Sistemas	**$D_{4,3}$ ± desvío estándar (µm)**			
	No inoculadas		**Inoculadas**	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
A	16.91 ± 0.12 A, a	17.46 ± 0.12 A, ab	18.07 ± 0.09 A, bc	18.29 ± 0.27 AB, c
B	20.89 ± 0.53 B, a	21.01 ± 0.37 B, a	22.67 ± 0.18 B, b	23.08 ± 0.38 C, b
C	71,20 ± 0.36 C, ab	70,65 ± 0,27 C, b	72,98 ± 0,06 C, ac	73,33 ± 0,86 D, c
D	32,09 ± 0,01 D, a	32,49 ± 0,09 D, a	41,90 ± 0,09 D, c	42,01 ± 0,06 E, c
E	18,06 ± 0,25 E, a	19,52 ± 0,19 E. b	18,72 ± 0,09 A, ab	19,35 ± 0,58 B, ab
F	13,10 ± 0,01 F, a	14,51 ± 0,13 F, b	16,75 ± 0,04 E, c	17,28 ± 0,20 AF, d
G	15,09 ± 0,18 G, a	16,25 ± 0,26 G, a	15, 59 ± 0,35 F, a	18,75 ± 0,82 AB, b
H	14,58 ± 0,15 FG, a	13,88 ± 0,16 F, b	15,25 ± 0,20 F, c	15,93 ± 0,11 F, d

Letras mayúsculas comunes dentro de la misma columna o letras minúsculas comunes en la misma fila significan que los parámetros no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Al agregar sal, la repulsión electrostática entre las gotas disminuye y con el tiempo se podría favorecer la floculación y resultar en la coalescencia de las gotas. Las gotas de aceite más grandes son más inestables que las pequeñas, y más propensas a unirse y desestabilizarse. Por esta razón, los sistemas con NaCl son más vulnerables a la floculación y los parámetros $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ aumentaron con el tiempo de almacenamiento (7 días). La desestabilización de la emulsión por la sal también se ha observado en emulsiones del tipo aderezos para ensalada y emulsiones de aceite de soja y aceite de maíz (Demetriades y McClements 1998, Martinez et al. 2007, Klinkesorn y Namatsila 2009).

Efecto de los depresores de la actividad de agua y de *Z. bailii* sobre el potencial Z

En la **Tabla 3** se muestran los resultados de Zp de los sistemas analizados. Todas las emulsiones presentaron valores negativos de Zp a pH 3,50, lo que se explica por su estructura aniónica, y valores negativos absolutos mayores a 30 mV, lo que sugiere que las partículas se repelen entre sí y que las dispersiones son estables (Carneiro-da-Cunha et al. 2011). Se observaron algunas diferencias significativas entre los valores de Zp de acuerdo con la composición del sistema. Un aumento de 0,250 a 1,000% de GX promovió una ligera disminución del valor absoluto de Zp en todos los casos (**Tabla 4**, sistemas A vs. B, C vs D, E vs F y, G vs H). Las emulsiones que contenían NaCl (sistemas C y D) presentaron los menores valores absolutos de Zp, siendo menos estables. Estos resultados podrían atribuirse a los efectos de apantallamiento electrostáticos o a

la acumulación de iones de signo contrario (Na^+ ó Cl^-) alrededor de la superficie de las gotas (McClements 1999, 2004, Klinkesorn y Namatsila 2009). La disminución provocada por la sal también se ha observado en emulsiones estabilizadas con Tween 80 y quitosano (Klinkesorn y Namatsila 2009). Por otra parte, el menor valor absoluto de Zp se correlaciona con los mayores valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ obtenidos, como se informó anteriormente (**Tabla 2**).

Tabla 3. Potencial zeta (Zp) de las emulsiones estudiadas y de células de *Z. bailii.*

Sistema	**Zp**
A	-49.60 ± 0.76 a
B	-47.60 ± 1.65 a
C	-36,40 ± 1.98 c
D	-31,21 ± 4,03 d
E	-41,20- ± 1.27 b
F	-40,90 ± 1,41 b
G	-46,90 ± 2.15 b
H	-42,21 ± 2,38 b
Z. bailii	-18.80 ± 5.80 e

El error corresponde a la desviación estándar. Dentro de cada columna, los valores señalados con la misma letra no presentan diferencias significativas (P< 0,05).

Zygosaccharomyces bailii presentó un valor negativo de Zp, así como las emulsiones, por lo tanto no se esperan fuerzas de atracción electrostática entre las células y las gotas de emulsión. El valor de Zp de *Z. bailii* se encuentra dentro del rango de valores de Zp informados para otras levaduras de deterioro (Brugnoni et al. 2007). Ly et al. (2006), al evaluar el efecto de las bacterias sobre la estabilidad de emulsiones, observó que las bacterias desestabilizaron las emulsiones elaboradas con los tensioactivos iónicos, laurilsulfato sódico y bromuro de cetiltrimetilamonio, pero no a las elaboradas con uno no iónico, Tween 20. Esto sugiere que la interacción entre las bacterias y las gotas son principalmente debido a las fuerzas electrostáticas. Esto explicaría por qué la levadura no desestabiliza las emulsiones ya que se repele con las gotas de las emulsiones cargadas negativamente. Como se discutió anteriormente, los $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ generalmente no se vieron afectados por la inoculación. Estos resultados muestran la importancia de la carga superficial de las bacterias en la estabilidad de las emulsiones. El efecto de los microorganismos en las emulsiones depende no sólo de la superficie interfacial y de la concentración microbiana, sino también de la cepa, especialmente con respecto al potencial zeta y al punto isoeléctrico. Cuando la combinación de la concentración de los microorganismos y la carga en la superficie es suficiente para neutralizar la carga de las gotas de aceite, la adición de los microorganismos desencadena la separación completa de fases (Ly et al., 2006).

CONCLUSIONES

Los distintos humectantes utilizados mostraron una marcada influencia sobre la estabilidad de las emulsiones, lo que se pudo evidenciar en los distintos tamaños de gota y Zp obtenidos. El xilitol y la glucosa estabilizaron las emulsiones ya que disminuyeron el $D_{3,2}$ y el $D_{4,3}$. La magnitud de este efecto dependió del nivel de GX, ya que en las emulsiones con menor contenido GX y xilitol se vio incrementado el $D_{4,3}$ con respecto a los sistemas libres de humectantes. Por otra parte, la adición de NaCl desestabilizó a las emulsiones ya que aumentó ambos diámetros y disminuyó los valores absolutos de Zp, efecto que se vinculó con la reducción de la repulsión electrostática entre las gotas. Esta tendencia se vio contrarrestada con el aumento del contenido de GX, la cual ayudaría a estabilizar las emulsiones con NaCl. Por otra parte, se

comprobó que la contaminación con la levadura puede desestabilizar las emulsiones y este efecto depende de la composición del sistema.

Los resultados obtenidos indican que los factores estudiados afectaron significativamente ($p \leq 0,05$) la estabilidad física de emulsiones ácidas y esta tendencia debe considerarse en la selección del humectante a usar.

BIBLIOGRAFIA

Brugnoni LI, Lozano JE, Cubitto MA. 2007. Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. Food Research International, 40: 332–340.

Camino NA, Perez OE, Pilosof AMR. 2009. Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. Food Hydrocolloids 23: 1089–1095.

Carneiro-da-Cunha MG, Cerqueira MA, Souza BWS, Teixeira JA, Vicente AA. 2011. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multinanolayered films production. Carbohydrate Polymers, 85: 522–528.

Castro M, Garro O, Gerschenson LN, Campos CA. 2003. Interaction between potassium sorbate, oil and tween 20: Its effect on the growth and inhibition of *Z. bailii* in model salad dressings. Journal of Food Safety. 23:47-59.

Demetriades K, McClements DJ. 1998. Influence of dextran sulfate and NaCl on the flocculation of oil-in-water emulsions stabilized by a nonionic surfactant. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:3929–3935.

Evans DF, Wennerström H. 1994. The Colloidal Domain.Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet. VCH Publishers, New York.

Gliemmo MF, Latorre ME, Gerschenson LN, Campos CA. 2010. Effect of sweet solutes on the quality of a Pumpkin puree (Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret) preserved by the hurdle technology. Journal of Food Processing and Preservation, 20:71-80.

Huang X, Kakuda Y, Cui W. 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. Food Hydrocolloids, 15: 533-542.

Joscelyne, SM, Trägårdh G, 2000. Membrane emulsification - a literature review. J. Membr. Sci. 169: 107-117.

Klinkersorn U, Namatsila Y. 2009. Influence of chitosan and NaCl on physicochemical properties of low-acid tuna oil-in-water emulsions stabilized by non-ionic surfactant. Food Hydrocolloids. 23:1374-1380.

Kurtzman CP, Rogers PR, Hesseltine CW. 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. Applied of Microbiology and Biotechnology. 21: 870-874.

Leroux J, Langendorff V, Schick G, Vaishnav V, Mazoyer J. 2003. Emulsion stabilizing properties of pectin. Food Hydrocolloids 17: 455-462.

Li J, McClements DJ, McLandsborough LA. 2001. Interaction between Emulsion Droplets andEscherichia coli Cells. Journal of Food Science, 66: 570-657.

Ly MH, Naïtali-Bouchez M, Meylheuc T, Bellon-Fontaine MN, Le TM, Belin JM, Waché Y. 2006. Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. International Journal of Food Microbiology, 112: 26–34.

Martinez I, Riscardo MA, Franco JM. 2007. Effect of salt content on the rheological properties of salad dressing-type emulsions stabilized by emulsifier blends. Journal of Food Engineering, 80: 1272–1281.

McClements DJ. 1999. Emulsion Stability. En: Food Emulsions. Principles, Practice, and Technics. Ed: CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos. 7:185-232.

McClements DJ. 2004. Food emulsions: Principles, practice and techniques. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.

McClements DJ. 2007. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47:611–649.

Parker A, Gunning PA, Ng K, Robins MM. 1995. How does xanthan stabilise salad dressing? Food Hydrocolloids, 9: 333-342.
Sikora M, Badrie N, Deisingh AK, Kowalski A. 2008. Sauces and Dressings: A Review of Properties and Applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48:50–77.
Smittle RB y Flowers RS. 1982. Acid tolerant microorganisms involved in the spoilage of salad dressing. Journal of Food Protection. 45:977-983.
Smittle RB, Cirigliano MC. 1994. Salad Dressings. Cáp. 53. En: Vanderzant C. y Splittstoesser DF, editores. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3ra. Ed., New York, Estados Unidos.
Pszczola DE. 2001. Salad Days? Not for these dressings. Food Technology, 55: 78-84.
Tilbury RH. 1980a. Xerotolerant yeasts at high sugar concentrations. En: Gould GW, Corry JEL, editores. Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment. Society for Applied Bacteriology Technical Series, vol. 15. Academic Press, London, pag. 103–128.
Tilbury RH. 1980b. Xerotolerant (osmophilic) yeasts. En: Skinner FA, Passmore SM, Davenport RR, editores. Biology and Activity of Yeasts. Society for Applied Bacteriology, Symposium Series. Academic Press, London, pag. 153–179.
Walstra P. 1983. Formation of emulsions. En Encyclopedia of emulsion technology. Vol. 1: Basic theory. Becher P, editores. New York: Marcel Dekker, Inc. pag. 57-127.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.