

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

CONSERVACIÓN E INOCUIDAD

Aguirre, Alicia

Conservación e inocuidad : trabajos completos : VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016 / Alicia Aguirre ; Agustin Gonzalez ; Rolando Pécora ; compilado por Alberto Edel León ; editado por Victoria Rosati ; Carlos Walter Robledo ; Alberto Edel León. - 1a ed. adaptada. - Córdoba : Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-45380-2-4

1. Alimentos. 2. Conservación de Alimentos. 3. Actas de Congresos. I. León, Alberto Edel , comp. II. Rosati, Victoria , ed. III. Robledo, Carlos Walter, ed. IV. León, Alberto Edel , ed. V. Título.

CDD 664

ISBN 978-987-45380-2-4



PRÓLOGO

En los últimos años, el desarrollo de nuevos métodos y técnicas de envasado de alimentos no sólo han aumentado la vida útil de los alimentos, sino que también ha mejorado su seguridad y calidad.

Este libro de trabajos completos presenta los últimos logros y desarrollos científicos sobre conservación, almacenamiento e inocuidad de los alimentos que fueron expuestos en la sexta edición del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, llevado a cabo en Córdoba, Argentina los días 2, 3 y 4 de noviembre de 2016.

Los artículos que lo componen proporcionarán al mundo académico y a la industria una plataforma para discutir nuevos conceptos y tecnologías necesarios para avanzar en el desarrollo de nuevos materiales de envases y nuevas tecnologías de conservación de alimentos. También permitirán examinar la influencia de los materiales y los procesos sobre la vida útil y la inocuidad de los alimentos. Esperamos que este libro responda a las necesidades de todos aquellos interesados en el área de envasado, vida útil e inocuidad de los alimentos.

EDITORES

Alicia Aguirre.
Agustín Gonzalez.
Rolando Pécora.



Utilización de cera natural de abeja para cobertura en quesos artesanales

Aimar B.N; Picotti J.H; Bonafede M.F

INTI Lácteos Rafaela

baimar@inti.gob.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es ofrecer al productor de quesos artesanales una herramienta que le permita extender la vida útil de sus productos y otorgarle al queso una característica regional.

Inicialmente se realizó una prueba preliminar aplicando respectivamente 1, 2 y 3 capas de cera purificada, a quesos semiduros de 300 g. Luego se analizó el comportamiento a los 60 días de maduración y se determinó un comportamiento óptimo con 3 capas de cera. En segunda instancia se realizó un estudio comparativo, durante 60 días de maduración, entre quesos semiduros cubiertos con tres capas de cera natural de abeja y quesos semiduros envasados con bolsas plásticas al vacío. Se realizaron análisis microbiológicos, análisis fisicoquímicos y análisis sensorial durante los 60 días de almacenamiento.

Los datos fueron estadísticamente analizados mediante la utilización de un software (R-project versión 3.2.3), donde no fueron encontradas diferencias significativas en las determinaciones realizadas entre los grupos analizados. Además, se realizó un test de normalidad para comprobar la distribución. Podemos concluir enunciando que el recubrimiento de cera natural de abeja se comporta de manera muy similar al envasado en bolsas plásticas al vacío.

Palabras clave: Quesos, cera de abeja, envasado.

ABSTRACT

The objective of the present study is to offer a tool that allows you to extend the life of their products and give the cheese a characteristic regional producer of artisan cheeses.

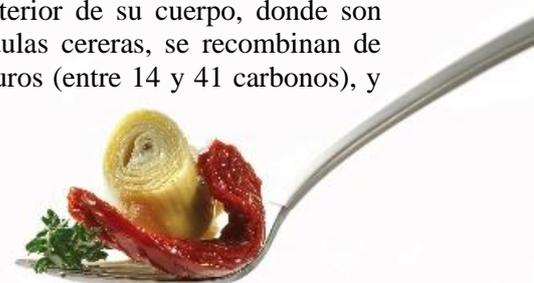
Initially be carried out a test preliminary applying respectively 1, 2 and 3 layers of wax purified, to cheese semi-hard of 300 g. Then is analyzed the behavior to them 60 days of maturation and is determined a behavior optimal with 3 layers of wax. In the second instance is a study comparative, during 60 days of ripening, between medium-soft cheese covered with three layers of natural beeswax and semi-soft cheeses wrapped with plastic bags to vacuum. Microbiological analyses were performed, physico-chemical analysis and sensory analysis during 60 days of storage. The data were statistically analyzed using software (R-project version 3.2.3), which were not found significant differences in measurements made between the groups analyzed. In addition, we performed a test of normality to check the distribution. We can conclude by stating that the coating of natural beeswax behaves very similarly to plastic bag vacuum packaging.

Keywords: Cheeses, beeswax, packaging.

INTRODUCCIÓN

La cera de abeja es un producto graso producido por las abejas para construir sus panales. La obtención de la cera de abejas se hace mediante la práctica de la apicultura, actividad dedicada a la crianza y cuidado de las abejas con el fin de recolectar y aprovechar los productos que se obtienen del trabajo de dichos insectos. Las abejas segregan la cera de entre los 12 y 30 días de edad en forma de pequeñas escamas redondeadas en las cuatro glándulas centrales que tienen en la parte inferior del abdomen, y se sintetiza como una reducción de azúcares de origen alimenticio. La cera recién producida por las abejas, tiene un color blanco, pero va adquiriendo un color amarillento a medida que entra en contacto con las abejas, la miel, el polen y el propóleo.

Las fases del proceso de fabricación de la cera de abejas son: las abejas ingieren miel, y en el intestino se absorben las moléculas de los azúcares (6 carbonos). De allí pasan al interior de su cuerpo, donde son transformados en fragmentos pequeños (2 carbonos). Luego, en las glándulas cereras, se recombinan de diferente manera para formar por un lado los ácidos grasos y los hidrocarburos (entre 14 y 41 carbonos), y



por otro los esteres y los alcoholes de la cera (entre 28 y 54 carbonos). La mezcla de estos productos es lo que se conoce como cera de abejas (Gómez, 2002).

La cera de abeja, es un material inerte con alta plasticidad a temperatura relativamente baja (alrededor de 32°C). Su punto de fusión no es constante, ya que la composición varía levemente dependiendo de su origen. Los valores citados típicos se encuentran entre 62°C a 65°C (Morgan, J.Townley, S. y Smith, R. 2002).

El objetivo del presente trabajo es ofrecer al productor de quesos artesanales una herramienta que le permita extender la vida útil de sus productos y otorgarle al queso una característica regional. Dicha investigación, surge como una necesidad de los productores de quesos artesanales del noroeste de la Provincia de Córdoba. Se pretende además, aprovechar un recurso disponible, como lo es la cera de abeja, dado que dentro de la diversidad productiva del mencionado territorio, la apicultura es una actividad muy importante.

Cabe remarcar que al producto se lo suele proteger para: evitar la contaminación y/o el desarrollo de microorganismos, minimizar la pérdida de humedad, aumentar la resistencia al transporte y por cuestiones relacionadas a aspectos visuales y de comercialización. Es necesario aplicar una protección primaria para recubrir su corteza o proteger una porción una vez fraccionado, entre los materiales más utilizados podemos encontrar a la parafina, bolsas plásticas al vacío, papel de aluminio, pintura plástica, entre otros métodos y/o materiales. En algunos casos se suele aplicar una protección secundaria para transportar los quesos para su venta, por ejemplo, cajas de cartón, de madera, plásticas y cualquier material aprobado para su uso en alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En primera instancia se realizó la purificación de la cera, para ello existen varios métodos, en este trabajo optamos por el método natural que consiste en colocar la cera en baño maría a 65°C en un recipiente de acero inoxidable y mantener la cera a esa temperatura durante una hora, luego la cera se enfría y solidifica a temperatura ambiente, se retira del recipiente y se extraen las impurezas que quedan en la cara inferior del bloque formado mediante un instrumento cortante.

Luego se realizó una prueba preliminar aplicando 1 – 2 y 3 capas respectivamente a quesos semiduros de 300 g, se analizó el comportamiento a los 60 días de maduración y se determinó un comportamiento óptimo con 3 capas de cera, dado que la cobertura no presentó grietas y/o rajaduras, y en la corteza del queso no se observaron modificaciones al retirar la cera.

A continuación, se realizaron dos elaboraciones de quesos en dos días diferentes, conformándose de esta manera el LOTE 1 y el LOTE 2. Durante ambas elaboraciones se utilizaron 30 l de leche de vaca para elaborar quesos mini-gouda (pasta semidura), obteniendo 10 piezas de 300 g c/u. En cada elaboración se envasaron 5 piezas al vacío y 5 piezas fueron cubiertas con tres capas de cera de abeja. Luego se efectuó la maduración de los quesos a 10 °C y 80 % de humedad relativa.

Durante la maduración de los quesos se realizaron los siguientes ensayos:

Ensayos Físicoquímicos a los días 0, 30 y 60.

- Humedad: ISO 5534 IDF 4:2004
- Materia grasa: ISO 1735 IDF4:2004
- Índice de maduración: Gripón et al - Le Lait N° 548-1975 (Solo a los 60 días).
- Determinación del perfil de Ácidos Grasos Libres Volátiles (AGLV): Destilación por arrastre con vapor de los ácidos grasos y posterior cuantificación de los ácidos grasos libres volátiles por cromatografía gaseosa (Solo a los 60 días).

Ensayos Microbiológicos a los días 0, 30 y 60.

- Mohos y levaduras: Norma ISO 6611- FIL 94: 2004
- Microorganismos a 30°C: Norma ISO 4833-1: 2013
- Coliformes y Escherichia Coli: Método de film seco rehidratable - PETRIFILM TM - 48 ± 2 hs / 35 ± 1°C (según AOAC).

Ensayos de Evaluación Sensoriales a los días 30, 45 y 60.

- Ensayo descriptivo: Determinación y comparación de perfiles sensoriales entre los quesos envasados al vacío y los recubiertos con cera de abeja. El análisis se realizó por duplicado con un panel de 6 integrantes entrenados para la degustación de quesos.

Finalmente se efectuó un procesamiento estadístico de datos mediante la utilización de un software (R-Project versión 3.2.3).



RESULTADOS Y DISCUSION

DETERMINACIÓN	RESULTADOS				
	DIA 0	DIA 30		DIA 60	
		E. Vacío	C. Cera	E. Vacío	C. Cera
Humedad (g/100 g)	43,03 ± 0,16	42,75 ± 0,19	42,39 ± 0,19	42,26 ± 0,42	42,47 ± 0,42
Materia Grasa (g/ 100 g)	27,49 ± 0,09	27,54 ± 0,32	27,88 ± 0,09	28,19 ± 0,42	28,76 ± 0,42

DETERMINACIÓN	RESULTADOS				
	DIA 0	DIA 30		DIA 60	
		E. Vacío	C. Cera	E. Vacío	C. Cera
Humedad (g/100 g)	43,03 ± 0,16	42,75 ± 0,19	42,39 ± 0,19	42,26 ± 0,42	42,47 ± 0,42
Materia Grasa (g/ 100 g)	27,49 ± 0,09	27,54 ± 0,32	27,88 ± 0,09	28,19 ± 0,42	28,76 ± 0,42

Tabla 1: Porcentaje de Humedad y Materia grasa efectuados a los días 0, 30 y 60.

Tabla 2: Resultados de los ensayos de Índice de Maduración realizados a los 60 días.

DETERMINACIÓN	RESULTADOS (60 Días)	
	Envasado al vacío	Con cera
Nitrógeno total (g/100 g)	3,8388	3,8953
Proteínas (g/100 g)	24,49	24,85
Nitrógeno soluble (g/100 g)	0,4626	0,4724
Nitrógeno no proteico (g/100 g)	0,2830	0,2863
Nitrógeno soluble al AF (g/100 g)	0,070	0,063



Tabla 3: Resultados de la determinación del perfil de Ácidos Grasos Libres Volátiles (AGLV) realizados a los 60 días.

ACIDOS GRASOS LIBRES VOLATILES (mg/100 g b/h)	QUESO ENVASADO AL VACIO	QUESO CON APLICACIÓN DE CERA
C2:0	31,12	28,93
C3:0	0,82	0,35
Ci4:0	0,39	0,10
C4:0	5,54	4,92
Ci5:0	0,71	0,24
C6:0	3,61	2,34

Tabla 4: Resultados de los ensayos Microbiológicos realizados a los días 0, 30 y 60.

DETERMINACIÓN	RESULTADOS				
	DIA 0	DIA 30		DIA 60	
		E. Vacío	C. Cera	E. Vacío	C. Cera
Mohos y levaduras (ufc/gr)	$<1,0 \times 10^2$	M: $1,9 \times 10^2$ L: $6,5 \times 10^2$	M: $7,0 \times 10^1$ L: $1,7 \times 10^2$	M: $4,0 \times 10^1$ L: $2,2 \times 10^2$	M: $1,1 \times 10^2$ L: $2,9 \times 10^2$
RT a 30°C (ufc/gr)	$5,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
Coliformes y E. Coli (ufc/gr)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Tabla 5: Resultados del ensayo de Evaluación Sensorial realizado sobre los quesos envasados en bolsas plásticas al vacío a los días 30, 45 y 60.

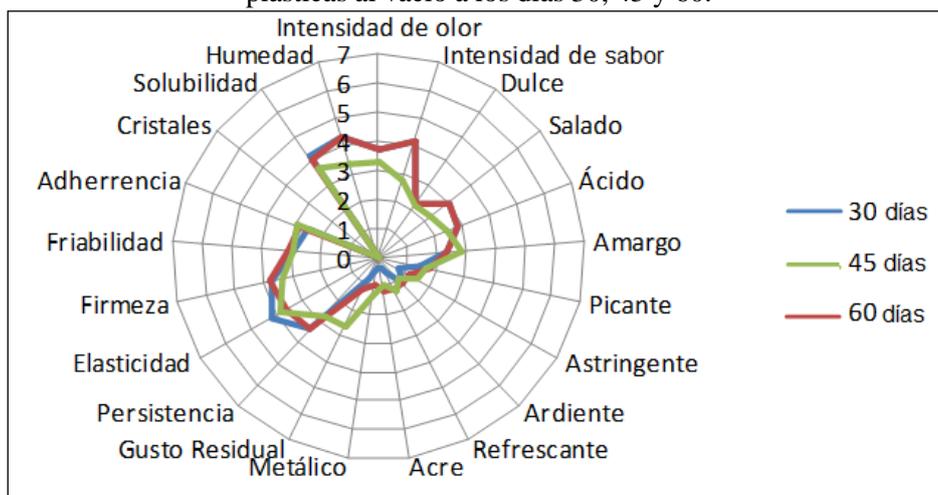


Tabla 6: Resultados del ensayo de Evaluación Sensorial realizado sobre los quesos con cobertura de cera natural de abeja a los días 30, 45 y 60.



Los resultados obtenidos muestran similitudes en el comportamiento de los quesos cubiertos con cera natural de abeja respecto a los envasados en bolsas plásticas al vacío. Desde el punto de vista fisicoquímico, la pérdida de humedad es del 1,30% para los quesos cubiertos con cera natural de abeja y de 1,79% para los quesos envasados en bolsas plásticas al vacío tal como se observa en la **Tabla 1**.

La maduración es la etapa del proceso de elaboración del queso durante la cual la cuajada fresca se transforma en una masa homogénea y se desarrollan las características organolépticas típicas del queso: aspecto, textura, sabores, aroma. Esto se debe a una serie de cambios bioquímicos, de reacciones glicolíticas, lipolíticas y proteolíticas, estas últimas como las principales causantes de los cambios de textura durante la maduración del queso (Desmazeau y Gripon, 1977; Fox, 1999).

La proteólisis en el queso se produce por la acción de las enzimas presentes: las proteinasas de la leche, las enzimas coagulantes, los cultivos iniciadores y otros microorganismos que se desarrollan en el queso (Sánchez-Ponte, 2003). Por ende las fracciones nitrogenadas que se observan en la **Tabla 2**, para ambos quesos nos muestran que tales reacciones ocurrieron bajo condiciones similares independientemente del envase utilizado.

A su vez, durante la maduración, se producen transformaciones que involucran a la materia grasa originándose ácidos grasos libres volátiles (AGLV). La **Tabla 3** nos muestra similitudes en los AGLV generados de manera cualitativa y cuantitativa.

Desde el punto de vista microbiológico, se presentaron bajos recuentos de hongos y levaduras en ambos quesos, y un recuento total de aerobios mesófilos similar.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en evaluación sensorial, las **Tablas 5 y 6**, nos muestran que ambos quesos presentan atributos sensoriales similares

CONCLUSIONES

Los datos fueron estadísticamente analizados mediante la utilización de un software (R-project versión 3.2.3), donde no fueron encontradas diferencias significativas en las determinaciones realizadas entre los grupos analizados. Además, se realizó un test de normalidad para comprobar la distribución. Podemos concluir enunciando que el recubrimiento de cera natural de abeja se comporta de manera muy similar al envasado en bolsas plásticas al vacío.



BIBLIOGRAFÍA

Gomez, A. (2002). La Cera de Abeja Control y Factores de Calidad. [Página web en Línea]. Disponible en: <http://www.mieldemalaga.com/asociacion/jornadas/ponencias/texto04-4.pdf> [Consulta: 2016, Septiembre 18].

Morgan, J., Townley, S., Y Smith, R. (2002). Measurement of physical and mechanical properties of beeswax. *Materials Science and Technology*.

Sanchez-Ponte, M. D. Maduración acelerada de queso con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. En: *Revista Científica, FCV – LUZ*. 2003, 13(4):299-306.

Desmazeau, M.J.; Gripon, J.C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. En: *Milchwissenschaft*, 1977, 32: 731-734.

Fox, F.P.; Law, J.; MC Sweeney, P.L. H; Wallace, J. Biochemistry of cheese ripening. En: Fox, F.P. *Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects*. 2a. ed., vol.1. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 389.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de los laboratorios de fisicoquímica, microbiología y evaluación sensorial de INTI Lácteos sede Rafaela por la colaboración brindada. A Héctor Lammens, apicultor de Villa del Soto (Cba), por proveernos muy gentilmente la cera para efectuar los ensayos. A los productores queseros de Traslasierras por permitirnos presentar este trabajo.



Parámetros texturales y aceptabilidad sensorial en productos precocidos de kiwicha (*Amaranthus caudatus*) durante el almacenamiento

Burgos V.E.¹, Jiménez P.L.², Armada M.²

(1) CONICET – Instituto de Investigación para la Industria Química (INIQUI). Universidad Nacional de Salta, Argentina. (2) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta, Argentina.

veritoburgos1@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar parámetros texturales y aceptabilidad de productos precocidos de kiwicha almacenados durante 120 días. Se trabajó con kiwicha inflada (KI) y laminada (KL) (*Amaranthus caudatus*) y amaranto inflado comercial (AIC). Se almacenaron en condiciones ambientales (tiempos 0, 1, 2, 3, 4: 0, 30, 60, 90 y 120 días) y se ensayaron: test TPA, humedad, actividad de agua (a_w), aceptabilidad, preferencia, intención de compra y consumo. Análisis estadístico: varianza y test Tukey, valores Z ($p < 0,05$) y Análisis de Componentes Principales. La humedad y a_w , aumentaron durante su almacenamiento en todas las muestras. La fuerza de fractura, dureza y gomosidad aumentaron significativamente en el AIC y la KL y AIC presentaron mayor adhesividad en el T4. La KI presentó mayor crocancia, aceptabilidad, preferencia, intención de compra y consumo, con diferencias significativas entre el consumo y compra. La aceptabilidad de KL fue indiferente. En el AIC, la aceptabilidad, preferencia e intención de compra fueron bajas, disminuyendo durante el ensayo. Se observó una correlación negativa entre humedad y aceptabilidad, a_w y crocancia. Estos productos están caracterizados por su textura crocante, la cual es relevante para su aceptabilidad sensorial y deben ser mantenidos en buenas condiciones de almacenamiento.

Palabras clave: parámetros texturales, aceptabilidad, precocidos, kiwicha, almacenamiento.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate textural parameters and acceptability of pre-cooked of kiwicha, wich were stored for 120 days. We worked with both puffed and laminated kiwicha (KI and KL) respectively (*Amaranthus caudatus*). And with commercial puffed amaranth (AIC). They were stored at environmental conditions (times 0, 1, 2, 3, 4: 0, 30, 60, 90 and 120 days) and they were analyzed by: test TPA, moisture, water activity (a_w), acceptability, preference, purpose of consumption and buying. Statistical analysis: variance and Tukey test, Z values ($p < 0,05$) and PCA. The moisture and a_w were increased during storage for all samples. Fracture strength, hardness and gumminess increased significantly in AIC. KL and AIC showed higher adhesiveness in T4. KI had greater crispness, acceptability, preference, and purpose of consumption and buying, with significant differences between consumption and purchase. The acceptability of KL was indifferent. Acceptability, preference and purchase intent were low for AIC, decreasing more throughout the experimental period. A negative correlation between humidity and acceptability, a_w and crispness also was observed. These products are characterized by their crunchy texture, which is relevant to their sensory acceptability and must be kept in good storage conditions.

Key words: textural parameters, acceptability, precooked, kiwicha, storage

INTRODUCCIÓN

El amaranto es conocido en el Perú como kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Este tiene su origen en los Andes de América del Sur, presenta características nutricionales importantes. Es comúnmente usado como un producto inflado (Burgos y Armada 2015).

El análisis sensorial de los alimentos es un instrumento eficaz para el control de calidad y aceptabilidad en los mismos, ya que cuando un alimento se quiere comercializar, debe cumplir los requisitos mínimos de higiene, inocuidad y calidad del producto, para que éste sea aceptado por el consumidor. La evaluación sensorial es innata en el hombre ya que desde el momento que se prueba el producto, se hace un juicio acerca de él, si le gusta o disgusta, describe y reconoce sus características de sabor, olor, textura (Anzaldúa Morales 1994). La textura de los alimentos es una de las cualidades primarias que determinan su calidad sensorial.



Las características de fuerza-deformación son características importantes que describen la textura del material. Resultados de estudios, mostraron que tanto la materia prima como las semillas de amaranto inflado sometidos a pruebas de compresión se comportan como un cuerpo viscoelástico (Zapotoczny et al. 2006).

El análisis del perfil de textura (TPA) en los productos expandidos son una alternativa para el análisis sensorial ya que se correlacionan bien con este último (Liu et al. 2000, Veronica et al. 2006). Los alimentos considerados crujientes generan curvas irregulares de esfuerzo-deformación, la evaluación de la calidad de estos productos, parece estar correlacionado con lo sensorial, instrumental, características de la microestructura y aceptabilidad. Los parámetros relacionados con la crocantez y dureza son los más estudiados, los que indican una buena relación entre la percepción humana y el análisis instrumental de textura (Liu et al. 2000, Pamies et al. 2000, Veronica et al. 2006).

La actividad de agua es de fundamental importancia, y en base en ella se puede conocer el comportamiento de un producto, para prolongar la vida de anaquel. El contenido de agua por sí solo no proporciona información sobre la estabilidad de un alimento, por eso, productos con la misma humedad, presentan distintas vidas de anaquel; dicha estabilidad se predice mejor con la determinación a_w (Badui 2006). Como así también es importante el envase utilizado que deberá ser de baja permeabilidad al vapor de agua y máxima impermeabilidad al oxígeno (Mathon 2012). Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar parámetros texturales y aceptabilidad de productos precocidos de kiwicha durante 120 días de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se trabajó con granos de kiwicha (*Amaranthus caudatus*), proveniente de la localidad de Cachi, provincia de Salta, cultivadas en la misma finca, durante los años 2012 a 2015.

Obtención de productos precocidos

Para la obtención de KI, se utilizó un recipiente de aluminio para hacer pochoclos de maíz, el cual fue adaptado para la elaboración del producto inflado debido al tamaño pequeño de los granos de kiwicha. El recipiente consta de una tapa con hélice que permite mezclar los granos, a medida que se van inflando. Se utilizó una cocina de gas Tivoli 500 G.E. V/S 50CM (Argentina). Al término del proceso de inflado, se pasaron los granos reventados sobre una malla 16 Mesh (1190 mm– ASTM), los cuales fueron seleccionados para su posterior análisis. Al producto obtenido se lo denominó kiwicha inflada (KI). Las variables de proceso fueron:

- Humedad inicial: 7,20%
- Tiempo de expansión: 30 segundos
- Temperatura: $160^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para medir la misma se utilizó un termómetro infrarrojo marca CEM ($-50^{\circ}\text{C} - 500^{\circ}\text{C}$).

Para la elaboración de la KL, se utilizó un laminador doble tambor o rodillo, donde cada rodillo mide 39x40 cm de diámetro. Los granos de kiwicha fueron previamente humectados, con una relación (p/v) de granos de kiwicha/ agua (1/0,8). La muestra se aplicó sobre la superficie externa de un rodillo caliente, el cual gira sobre su eje horizontal. La capa del material permanece adherida al rodillo aproximadamente el 80% de una rpm; durante este tiempo, la humedad se evapora dejando una capa de sólidos que es removida de la superficie del rodillo por un raspador (Burgos y Armada 2015). Por trabajo previo realizado (Burgos et al. 2013), las variables de proceso fueron:

- Humedad inicial: 18%
- Velocidad de rotación de los rodillos: 5 rpm.
- Separación de los rodillos: 1 mm.
- Temperatura de los rodillos: 120°C
- Tiempo de residencia: 11 segundos.

Como patrón de referencia se utilizó un producto inflado de amaranto comercial (AIC) obtenido de una casa de productos dietéticos, ubicada en Salta.

Envasado

Se envasaron en bolsas de polietileno de alta densidad, espesor de 24 μm , posteriormente cerrados con selladora térmica (Zipari Modelo C300, Argentina).



Almacenamiento

Se almacenaron durante 0, 30, 60, 90 y 120 días en anaquel (junio-octubre) y la temperatura promedio del estudio fue de $22,39 \pm 2,31^{\circ}\text{C}$.

Determinación de parámetros de textura

Dado que los productos a evaluar presentan tamaño muy pequeño, se utilizó muestra a granel. Se utilizó un texturómetro (Brookfield QTS 25, USA). Se ensayó un Test TPA (Texture Profile Analysis) según Liu et al. (2000), con modificaciones. Se colocó la muestra en un recipiente (40 mm de diámetro x 50 mm de alto), llenando el mismo con la muestra a una altura de 30 mm. Se utilizó una sonda plana circular de 38,1 mm de diámetro. El mismo se movió hacia abajo hasta alcanzar un 40% de deformación y a una velocidad de 15mm/min. Se realizaron 2 ciclos de compresión, 6 repeticiones. Los parámetros texturales evaluados fueron:

Fuerza de fractura (FF): Fuerza máxima requerida para romper la muestra. Se expresó en g.

Dureza (D): Fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares. Se define como la fuerza necesaria para lograr una deformación dada y está representada por la altura del pico de la primera compresión. Se expresó en g.

Gomosidad (G): Simula la energía requerida para desintegrar un alimento semi-sólido para así este se pueda ingerir.

Adhesividad (A): Es el trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los que éste entra en contacto (por ejemplo, la lengua, los dientes, el paladar). Está representada por el área negativa observada luego de la primera compresión. Se expresó en g.

Cohesividad (C): instrumentalmente, es el cociente entre el trabajo realizado durante la segunda compresión dividida por el trabajo realizado durante la primera compresión. Es un parámetro adimensional. Szczesniak (2002) la define desde el punto de vista físico, como el grado en el que un material puede deformarse antes de que se rompa. Y desde el punto de vista sensorial, como el grado en el que se comprime una muestra entre los dientes antes de que se rompa.

Número de fracturas (crocancia): Este parámetro está relacionado con la crocancia de la muestra. Mayor número de fracturas, mayor crocancia de la misma.

Humedad y actividad de agua (a_w)

La humedad (g%) se determinó según, técnica oficial de la A.O.A.C, método 934.01 (Association of Official Analytical Chemists 1996). La actividad de agua fue determinada con un higrómetro AQUA LAB (Serie 3TE) calibrado a 25°C .

Prueba de Aceptabilidad

Para el desarrollo de la evaluación sensorial con consumidores, se utilizaron las instalaciones y el equipamiento del Instituto de Investigación Sensorial de Alimentos (IISA) de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta (UNSa). Participaron 60 consumidores en cada uno de los tiempos de control de esta prueba, con edades comprendidas entre 18 y 60 años, de ambos sexos. Las muestras fueron presentadas de forma simultánea en bandejas de acero inoxidable. Cada consumidor disponía de agua (20°C) para que se enjuaguen la boca y de un formulario de evaluación. En el mismo se presentó una escala hedónica de 7 puntos, donde 1 es “me disgusta muchísimo” y 7 es “me gusta muchísimo”. También se pidió a los consumidores que opinen respecto del color, olor, sabor y características texturales de los productos brindados. Finalmente, se realizó una prueba de preferencia y se preguntó acerca de la intención de compra y consumo si tuvieran el producto en su casa.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó usando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al.2008). Los datos fueron evaluados usando el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para un nivel de significancia $p < 0,05$. Se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey para establecer las diferencias significativas entre tratamientos.

Para establecer diferencias significativas entre la intención de consumo/compra en cada tiempo de almacenamiento por muestra, se calcularon los valores-Z ($p < 0,05$).

Se utilizó el análisis de componentes principales (ACP) en la matriz de correlación para reducir el número de variables y para seleccionar los parámetros más exigentes con valores factoriales superiores a 0,7.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de los parámetros texturales

Se observó un aumento de la humedad y a_w en función del tiempo de almacenamiento en todos los productos ($p < 0,05$). La KI presentó menor humedad inicial debido a la mayor temperatura a la que fue sometida, lo que provocó una reducción del 50% de su contenido de humedad. El otro producto precocido, KL, presentó mayor humedad que KI, debido a la humectación previa de los granos, necesaria para la gelatinización del almidón durante el proceso de laminado. En el AIC, al momento de su compra presentaba una humedad inicial mayor, en comparación con el resto de los productos, en especial si se lo comparaba con la KI dado que son productos inflados con similares características de elaboración. El AIC presentó mayor a_w al final del almacenamiento en relación con la KI y KL. En una investigación, donde se evaluó la influencia de la actividad de agua en la crocancia de productos snack, observaron que los valores críticos para este parámetro, comprendidas entre el rango de 0,35-0,50, donde los productos se convirtieron en organolépticamente inaceptables y las curvas de esfuerzo deformación cambiaron con el aumento de la actividad de agua (Katz y Labuza, 1981).

La textura es el atributo más crítico en la calidad de los cereales expandidos (Bourne 2002). En las propiedades texturales, influye la estructura propia del alimento. El estado físico del alimento afecta en forma importante a los alimentos de baja humedad (Roos 1995). Un pequeño cambio en el contenido de humedad afecta directamente la textura de los cereales expandidos y en consecuencia, son menos crocantes y resultan poco aceptables para los consumidores (Roopa et al. 2009). La crocancia se percibe a través de una combinación de sensaciones táctiles, cinestésicas, visuales y auditivas. Representa el atributo clave de la textura en los productos expandidos (Heidenreich et al. 2004). De esta manera, muchos de los alimentos que tienen estructuras celulares son más fáciles de morder, masticar y digerir y por su densidad son considerados como una típica matriz polimérica (Gibson y Ashby 1988).

Al evaluar la fuerza de fractura, dureza y gomosidad en la KI, se observó un aumento creciente en función del tiempo de almacenamiento observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) (**Tabla 1**), a excepción del tiempo 4 que disminuyó en comparación a los 90 días de almacenado, con un aumento de su adhesividad al final del estudio. En cuanto a la cohesividad que es un indicador de la viscoelasticidad del alimento, un valor próximo a 1 indica total elasticidad y un valor próximo a cero indica que la muestra no se recuperó en absoluto, en la KI se mantuvo constante presentando una leve disminución al final del almacenamiento. Katz y Labuza (1981), encontraron que la cohesividad en el maíz inflado fue un buen indicador de su característica crujiente. El número de fracturas, el cual está asociado a la crocancia del producto, fue alto al comienzo del almacenamiento y disminuyó al final del mismo. Esta característica es muy importante en los productos inflados, ya que disminuye su vida útil y por lo tanto su aceptabilidad (Lara y Mejía 2004).

Un aumento en el contenido de humedad provoca un ablandamiento de la pared celular de las matrices de un producto inflado, de manera tal que el efecto de plastificación del contenido de humedad es el responsable de tal comportamiento (Roopa et al. 2009). Del mismo modo, Martínez-Navarrete et al. (2004) mencionaron que el agua produce la plastificación y el ablandamiento de la matriz de almidón-proteína y por lo tanto altera la resistencia del producto.

En comparación con las otras muestras evaluadas, la KL presentó menor FF, la cual fue aumentando con el tiempo de almacenamiento observándose diferencias significativas ($p < 0,05$), excepto, a los 120 días que disminuyó (**Tabla 2**). La adhesividad aumentó principalmente en los últimos tiempos de almacenamiento lo cual se puede relacionar a un leve aumento del contenido de humedad del producto. Respecto a la cohesividad y número de fracturas, presentó valores más bajos en comparación con las otras muestras estudiadas. La cohesividad se mantuvo constante y el número de fracturas disminuyó con el tiempo de almacenamiento ($p < 0,05$).

En la **Tabla 3**, puede observarse que el AIC presentó mayor FF, dureza, gomosidad y adhesividad, al inicio del estudio en comparación con la KI, lo que podría deberse a las malas condiciones de almacenamiento durante su comercialización, los valores fueron aumentando durante todo el estudio observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) y un menor número de fractura respecto a la KI y disminución del mismo a los 90 días de almacenado.



Tabla 1. Parámetros analizados en Kiwicha Inflada según tiempos de almacenamiento

Parámetros	TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO				
	T0	T1	T2	T3	T4
Humedad	3,13±0,1 ^a	4,30±0,1 ^b	4,60±0,1 ^b	5,50±0,1 ^c	5,61±0,4 ^d
a _w	0,20±0,1 ^a	0,39±0,1 ^b	0,41±0,1 ^{bc}	0,43±0,1 ^c	0,44±0,1 ^d
FF	74,67±2,8 ^a	529,33±17,9 ^b	1157,33±77,9 ^c	20049,33±121,3 ^e	16713,33±140,0 ^d
Dureza	386,00±8,7 ^a	4614,66±329,1 ^b	6027,66± 23,8 ^b	22873,33±519,4 ^d	19328,33±176,6 ^c
Gomosidad	299,64±9,5 ^a	3061,22±22,2 ^b	4633,55±85,2 ^c	15634,91±74,3 ^e	12951,04±65,6 ^d
Adhesividad	-0,41±0,5 ^b	-2,97±0,5 ^a	-1,16±0,5 ^b	-0,93±0,3 ^b	-1,47±0,6 ^b
Cohesividad	0,78±0,0 ^b	0,66±0,0 ^a	0,77±0,0 ^b	0,66±0,0 ^a	0,60±0,0 ^a
Nº Fractura	13,33±3,7 ^b	11,67±0,6 ^b	3,68±1,5 ^a	3,33±0,5 ^a	2,67±0,6 ^a

Promedio ± desvío estándar (n=6). Medias en la misma fila con letra diferente son significativamente diferentes (p<0,05).

T0, T1, T2, T3 y T4: Tiempos de almacenamiento (0, 30, 60, 90 y 120 días, respectivamente).



Tabla 2. Parámetros analizados en Kiwicha Laminada según tiempos de almacenamiento

Parámetros texturales	TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO				
	T0	T1	T2	T3	T4
Humedad	7,57±0,2 ^a	8,60±0,4 ^b	9,03±0,1 ^{bc}	9,67±0,3 ^c	9,81±0,6 ^c
a _w	0,42±0,0 ^a	0,44±0,0 ^{ab}	0,45±0,0 ^b	0,46±0,0 ^b	0,46±0,0 ^b
FF	3,36±0,0 ^a	6,66±1,1 ^{ab}	7,33±0,5 ^{ab}	15,33±8,7 ^b	6,33±0,5 ^{ab}
Dureza	649,67±43,5 ^a	3272±194,6 ^d	2478±166,1 ^c	1374±89,5 ^b	1133,33±42,2 ^b
Gomosidad	182,35±23,0 ^a	1080,23±101,6 ^d	773,19±167,7 ^c	449,18±36,8 ^b	403,05±50,9 ^{ab}
Adhesividad	-1,04±0,0 ^b	-2,11±0,6 ^{ab}	-1,16±0,4 ^b	-5,9±3,1 ^a	-4,37±0,4 ^{ab}
Cohesividad	0,28±0,0 ^a	0,33±0,0 ^a	0,31±0,0 ^a	0,33±0,0 ^a	0,35±0,0 ^a
N° Fractura	7,67±0,1 ^c	5,61±0,1 ^{bc}	3,67±0,5 ^{ab}	1,67±0,5 ^a	2,67±0,5 ^a

Promedio ± desvío estándar (n=6). Medias en la misma fila con letra diferente son significativamente diferentes (p<0,05).
T0, T1, T2, T3 y T4: Tiempos de almacenamiento (0, 30, 60, 90 y 120 días, respectivamente).



Tabla 3. Parámetros analizados en Amaranto Inflado Comercial según tiempos de almacenamiento

Parámetros texturales	TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO				
	T0	T1	T2	T3	T4
Humedad	8,17±0,3 ^a	9,47±0,1 ^b	9,67±0,2 ^b	9,97±0,4 ^c	10,00±0,8 ^d
a _w	0,45±0,0 ^a	0,47±0,0 ^b	0,48±0,1 ^b	0,50±0,0 ^c	0,53±0,1 ^d
FF	15914,41±580,7 ^{ab}	16568,33±396,8 ^b	17558,78±639,9 ^b	26919,33±161,4 ^c	13424,33±117,2 ^a
Dureza	15261±156,9 ^a	18724,33±579,8 ^b	19115,67±277,5 ^b	31449±314,1 ^c	14836,67±590,5 ^a
Gomosidad	7938,6±534,9 ^a	10425,99±750,6 ^b	11848,11±613,5 ^c	17400,97±144,1 ^d	7273,16±222,3 ^a
Adhesividad	-2,19±0,8 ^{ab}	-0,44±0,0 ^b	-1,46±0,33 ^b	-1,55±0,1 ^b	-4,35±1,9 ^a
Cohesividad	0,52±0,0 ^a	0,56±0,0 ^{ab}	0,62±0,0 ^b	0,55±0,0 ^{ab}	0,5±0,0 ^a
N° Fractura	6,67±1,5 ^c	5,67±0,5 ^{bc}	4,66 ±0,5 ^{bc}	3,67±0,5 ^{ab}	2,33±0,5

Promedio ± desvío estándar (n=6). Medias en la misma fila con letra diferente son significativamente diferentes (p<0,05).
T0, T1, T2, T3 y T4: Tiempos de almacenamiento (0, 30, 60, 90 y 120 días, respectivamente).



Aceptabilidad Sensorial

La **Tabla 4** muestra los valores promedios de aceptabilidad sensorial y porcentaje de preferencia de la KI, KL y el AIC, según tiempos de almacenamiento. El producto que presentó mayor aceptabilidad en todos los tiempos de almacenamiento fue la KI. La mayor aceptación de los consumidores se debe a que calificaban al producto como crujiente, sabor y olor agradable al tostarlo.

Para los consumidores, la KL les resultó indiferente, debido a que les parecía algo adhesivo, poco sabor, pero de olor agradable. Algunas de estas características coincidieron con los resultados evaluados instrumentalmente, no observándose diferencias significativas en cada tiempo de almacenamiento ($p > 0,05$).

El producto de menor aceptabilidad fue el AIC, la misma fue disminuyendo con el almacenamiento, llegando a disgustar levemente, a los 120 días (3,45), no siendo significativa ($p > 0,05$).

El producto de mayor preferencia fue la KI en todos los tiempos de almacenamiento, con valores superiores al 76% (**Tabla 4**). La KL, presentó una baja preferencia, aumentando esta durante su almacenamiento (8,62% a 18,67%), a pesar de su puntaje indiferente. Respecto al AIC, también presentó la menor preferencia, la cual fue disminuyendo con los días de almacenado (6,9% a 4,66%). Probablemente debido a que los consumidores percibían un sabor, olor y textura desagradable.

Tabla 4. Aceptabilidad y preferencia (%) según tiempos de almacenamiento

Productos		Aceptabilidad ¹	Preferencia
KI	T ₀	5,84±1,16 ^a	84,48
	T ₁	5,69±1,28 ^a	85,12
	T ₂	5,53±1,23 ^a	80,89
	T ₃	5,43±1,10 ^a	77,14
	T ₄	5,45±1,21 ^a	76,67
KL	T ₀	4,20±1,40 ^a	8,62
	T ₁	4,09±0,94 ^a	9,50
	T ₂	4,23±1,11 ^a	12,62
	T ₃	4,21±1,38 ^a	17,24
	T ₄	4,19±1,62 ^a	18,67
AIC	T ₀	3,94±1,23 ^a	6,90
	T ₁	3,93±1,27 ^a	5,38
	T ₂	3,93±1,56 ^a	6,49
	T ₃	3,83±1,64 ^a	5,62
	T ₄	3,45±1,63 ^a	4,66

¹Promedio ± desvío estándar (n=60). Medias en la misma columna con letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$). KI: Kiwicha Inflada; KL: Kiwicha Laminada; AIC: Amaranto Inflado Comercial. T₀, T₁, T₂, T₃ y T₄: Tiempos de almacenamiento correspondientes a 0, 30, 60, 90 y 120 días, respectivamente.

En las **figuras 1 a 3** se presenta el porcentaje de intención de compra y consumo para cada tiempo de almacenamiento de las KI, KL y el AIC, respectivamente.

La KI (**Figura 1**) presentó un mayor porcentaje de intención de compra entre un 77,59% (T₀) a 63,33% (T₄), disminuyendo esta en función del tiempo, probablemente por cambios durante el almacenamiento. Más del 83% de los degustadores consumirían el producto si lo tuvieran en su casa. Al comparar estos porcentajes en forma de proporciones a partir de los valores Z obtenidos (**Tabla 5**), se observa que existieron diferencias significativas entre el consumo/ no consumo y compra/ no compra, en todos los tiempos de almacenamiento, lo cual significa que se obtuvo un buen producto aceptable para su compra y consumo. Los valores Z más altos fueron para la KI almacenada a los 60 días (7,23) y 90 días (7,09), los cuales corresponden a que el 96,66% y el 96,65% de los consumidores, consumirían el producto, respectivamente, si lo tuvieran en su casa, pero en el T₃, el 67,24% (Z=2,63) lo compraría.



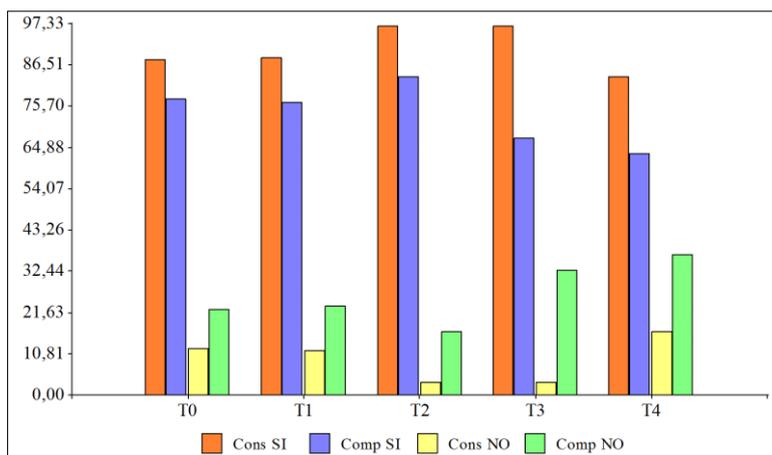


Figura 1. Intención de compra y consumo (%) de Kiwicha Inflada

T0, T1, T2, T3, T4: Tiempo de almacenamiento 0, 30, 60, 90, 120 días. Con: Consumo, Comp: Compra

Respecto a la KL (**Figura 2**), entre un 71,41% (T0) a 50,00% (T4) de los degustadores, no la consumirían, disminuyendo esta tendencia durante el ensayo. Respecto a la compra, el 19,97% (T0) a 35% (T4) comprarían el producto, aumentando este comportamiento con el tiempo de almacenamiento, es decir que la KL fue cada vez más aceptada para su compra. Los valores Z demuestran que no existen diferencias significativas respecto al consumo/ no consumo (excepto T0) pero si existen diferencias en la compra/ no compra. Los valores negativos significan que existieron mayores porcentajes de no aceptación para la compra y consumo del producto. Sin embargo los valores de Z disminuyeron, lo cual significa que aumentó su aceptación de compra y consumo, con el tiempo de almacenado. Esto se puede comprobar en la **Figura 2**. Por otro lado también se relaciona con el aumento del porcentaje de preferencia explicado anteriormente (**Tabla 4**).

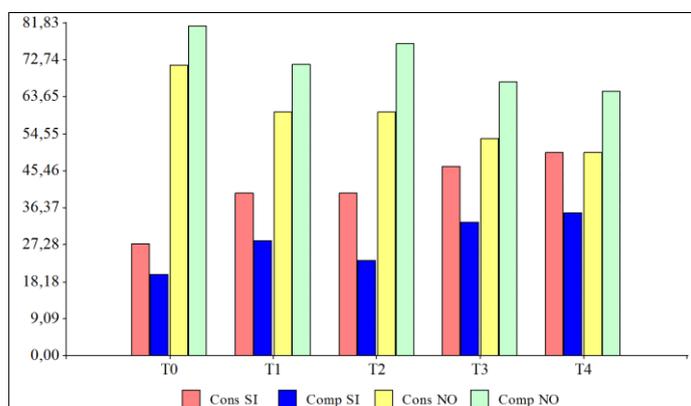


Figura 2. Intención de compra y consumo (%) de Kiwicha Laminada

T0, T1, T2, T3, T4: Tiempo de almacenamiento 0, 30, 60, 90, 120 días. Con: Consumo, Comp: Compra

Respecto al AIC, el 67,24% (T0) a 73,33% (T4) de los consumidores, no comprarían el producto y un 55,17% (T0) a 53,33% (T4), no lo consumirían si lo tuvieran en su casa (**Figura 3**). En la **Tabla 5**, los valores de Z demuestran que para la intención de consumo/ no consumo, en cada tiempo de almacenamiento, no presentan diferencias significativas. Mientras que en la intención de compra/ no compra, si se observaron diferencias, con un valor de Z alto para T4 (-3,61), es decir que un 73,33% no lo comprarían (**Figura 3**).



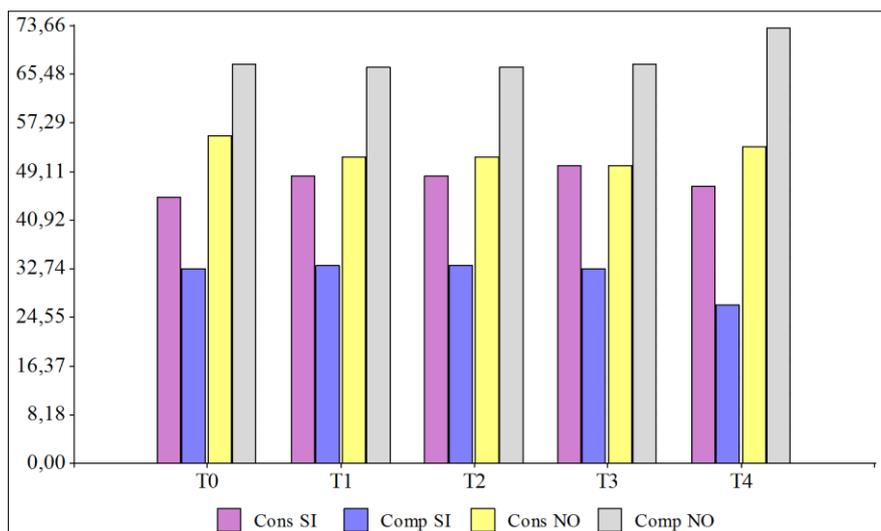


Figura 3. Intención de compra y consumo (%) de Amaranto Inflado Comercial T0, T1, T2, T3, T4: Tiempo de almacenamiento 0, 30, 60, 90, 120 días. Con: Consumo, Comp: Compra

Tabla 5. Valores-Z para la comparación entre Consumo/No Consumo y Compra/No Compra de KI, KL y AIC

Productos		Consumo/No Consumo Valores-Z	Compra/No Compra Valores-Z
KI	T ₀	5,78 s	4,20 s
	T ₁	5,93 s	4,03 s
	T ₂	7,23 s	5,06 s
	T ₃	7,09 s	2,63 s
	T ₄	5,16 s	2,06 s
KL	T ₀	-3,41 s	-4,73 s
	T ₁	-1,55 ns	-3,58 s
	T ₂	-1,55 ns	-4,38 s
	T ₃	-0,52 ns	-2,63 s
	T ₄	0 ns	-2,32 s
AIC	T ₀	-0,79 ns	-2,63 s
	T ₁	-1,02 ns	-2,58 s
	T ₂	-1,55 ns	-2,58 s
	T ₃	0 ns	-2,63 s
	T ₄	-0,52 ns	-3,61 s

KI: Kiwicha Inflada; KL: Kiwicha Laminada; AIC: Amaranto Inflado Comercial. T0, T1, T2, T3 y T4: Tiempos de almacenamiento correspondientes a 0, 30, 60, 90 y 120 días, respectivamente; s: diferencia significativa; ns: diferencia no significativa ($p < 0,05$).

Análisis de Componentes Principales (ACP)

La matriz de correlación del ACP para las KI, KL y el AIC por cada tiempo de almacenamiento, los parámetros texturales y aceptabilidad se muestran en la **Figura 4**.

Se observa que la KI hasta el T2, se asocia con una mejor aceptabilidad, crocancia (número de fractura), cohesividad, adhesividad. La KI en el T3 y T4, se alejaron un poco del cuadrante. Respecto a la KL, no se asoció con ninguna variable. Por otro lado, el AIC hasta el T3, mostró mayor dureza, fuerza de fractura y gomosidad. El AIC T4 se alejó del cuadrante y se asoció con mayor humedad y aumento de la a_w .

Los coeficientes de correlación en el ACP, mostraron una correlación negativa entre la humedad y aceptabilidad ($-0,95$, $p < 0,0001$), a_w y FF ($-0,79$, $p = 0,0004$), representados por el componente 1. La D (0,99)



y G (0,97) se correlacionaron positivamente con la FF ($p < 0,0001$), la G y D (0,99, $p < 0,0001$), representados por el componente 2. Estos valores son explicados con el 81,8% de la varianza.

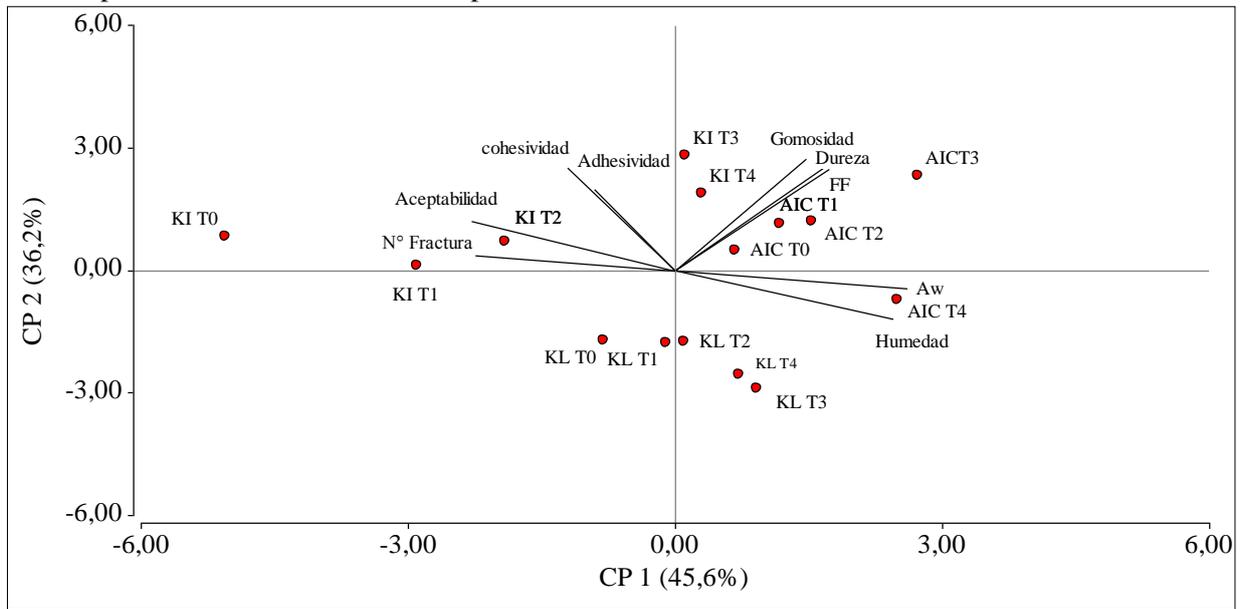


Figura 4. Análisis de Componentes Principales (ACP) de parámetros texturales y aceptabilidad de KI, KL y AIC por cada tiempo de almacenamiento

KI: Kiwicha Inflada; KL: Kiwicha Laminada; AIC: Amaranto Inflado Comercial. T0, T1, T2, T3 y T4: Tiempos de almacenamiento correspondientes a 0, 30, 60, 90 y 120 días, respectivamente.



CONCLUSIONES

La humedad y la a_w fueron parámetros críticos y muy importantes de evaluar.

Los parámetros texturales analizados instrumentalmente pudieron establecer que estos productos están caracterizados por su textura crocante la cual es relevante para su aceptabilidad sensorial y deben ser mantenidos en buenas condiciones de almacenamiento.

El producto KI presentó mejores parámetros texturales que el AIC, presentando una mayor crocancia. La KI puede ser consumido como cereal para desayuno o ingrediente en la elaboración de barras de cereales u otros productos.

El producto de mayor aceptabilidad fue la KI asociada a un mayor número de fracturas, mayor porcentaje de compra, consumo y preferencia en todos los tiempos de almacenamiento.

El de menor aceptación fue el AIC, debido a su mayor humedad, actividad de agua, gomosidad, dureza y fuerza de fractura. Por ello el desagrado y menor porcentaje de compra y consumo por parte de los consumidores.

La KL presentó menor fractura y mayor adhesividad. Estas características fueron percibidas por los consumidores, los cuales mostraron su indiferencia en la prueba de aceptabilidad. Sin embargo, se observó un aumento en la intención de compra, consumo y porcentaje de preferencia, con el tiempo de almacenamiento. De esta manera, para mejorar sus características sensoriales, podría ser incorporado en la formulación de otros productos tales como barras de cereales, productos de panificación y sopas instantáneas.

La opinión de los consumidores fue muy importante, ya que pudieron brindar su percepción frente a los productos evaluados, la cual se vio reflejada en los parámetros texturales medidos instrumentalmente.

BIBLIOGRAFIA

Anzaldúa Morales A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Zaragoza-España: Acribia. pag 214.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1996). Official methods of Analysis (16th ed.). Washington: AOAC Inc.

Badui S. 2006. Agua. En: Badui S, editor. Química de los alimentos. 4ª ed. D.F. México: Pearson Educación. pag 1-27.

Bourne MC. 2002. Principles of Objective Texture Measurement. In: Bourne M, editor. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. 2nd ed. New York. Academic Press. pag 107-189.

Burgos VE, Armada M. 2015. Characterization and nutritional value of precooked products of kiwicha grains (*Amaranthus caudatus*). Food Science and Technology, 35(3):531-538.

Burgos VE, Armada M, Lescano G. 2013. Calidad nutricional proteica de laminados de kiwicha, arroz y sémola de maíz. En XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), Buenos Aires, Argentina.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. 2008. InfoStat (Software), GrupoInfoStat, FCA-UNC, Argentina.

Gibson LJ, Ashby MF. 1988. Cellular Solids: Structure and Properties. Elmsford, NY: Pergamon Press. pag 60.

Heidenreich S, Jaros D, Rohm R, Ziems A. 2004. Relationship between water activity and crispness of extruded rice crisps. Journal of Texture Studies, 35: 621-633.

Katz EE, Labuza TP. 1981. Effect of Water Activity on the Sensory Crispness and Mechanical Deformation of Snack Food Products. Journal of Food Science, 46: 403-409.

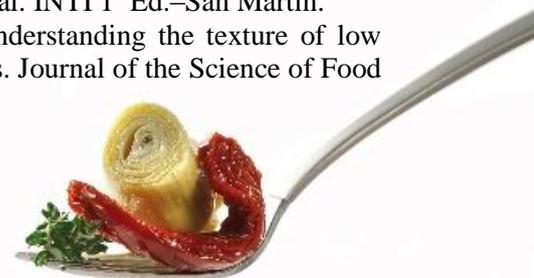
Lara N, Mejia A. 2004. Kinetics of deterioration and shelf life of popped grain, breakfast cereal and crunchy bars of amaranth. Quito, Estacion Experimental. Santa Catalina.

Liu Y, Hsieh F, Heymann H, Huff HE. 2000. Effect of process conditions on the physical and sensory properties of extruded oat-corn puff. Journal of Food Science, 65: 1253-1259.

Martínez-Navarrete N, Moragu G, Talens P, Chiralt A. 2004. Water sorption and the plasticization effect in wafers. International Journal of Food Science and Technology, 39: 555-562.

Mathon Y. 2012. Envases y embalajes. Inst. Nacional de Tecnología Industrial. INTI 1ª Ed.-San Martín.

Pamies BV, Roudaut G, Dacremont C, Meste ML, Mitchell JR. 2000. Understanding the texture of low moisture cereal products: mechanical and sensory measurements of crispness. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 1679-1685.



Roopa BS, Mazumder P, Bhattacharya S. 2009. Fracture behaviour and mechanism of puffed cereal during compression. *Journal of Texture Studies*, 40(2): 157-171.

Roos Y. 1995. Water activity and glass transition temperature. How do they complement and how do they differ? In: Barbosa-Cánovas G, Welti Chanes J, editores. *Food Preservation by Moisture Control (Fundamentals and Applications)*. Lancaster, PA: Technomic. pag 133-153.

Veronica AO, Olusola OO, Adebawale EA. 2006. Qualities of extruded puffed snacks from maize/soybean mixture. *Journal of Food Processing Engineering*, 29: 149-161.

Zapotoczny P, Markowski M, Majewska K, Ratajski A, Konopko H. 2006. Effect of temperature on the physical, functional, and mechanical characteristics of hot-air-puffed amaranth seeds. *Journal of Food Engineering*, 76: 469-476.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Mgs. Juan Robin en la utilización del laminador y desarrollo del producto kiwicha laminada y al Instituto de Investigación Sensorial de Alimento (IISA-UNSa) por permitirnos desarrollar el análisis sensorial.



Estudio de la cinética de degradación de antocianinas y color durante el almacenamiento de jugos de cassis y sauco

Busso C., Sánchez V., Baeza R.

Pontificia Universidad Católica Argentina - Facultad de Ciencias Agrarias, Cap. Gral. Ramón Freire 183 (1426), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

rosabaezabsas@yahoo.com.ar

RESUMEN

Durante el almacenamiento de productos basados en *berries*, el contenido de compuestos como antocianinas, así como su color, se ven afectados. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios en estas características y determinar parámetros cinéticos de la degradación durante el almacenamiento a 4, 25 y 38°C. Se midió el contenido de antocianinas monoméricas (AMT), porcentaje de color polimérico (%CP), parámetros de color en el espacio CIELab y el contenido de polifenoles totales (PT). Las cinéticas de degradación de AMT y parámetro a^* se ajustaron con un modelo de primer orden. Se obtuvieron velocidades de degradación de AMT mayores que para a^* , indicando una mayor estabilidad del color que para el contenido de AMT. Los valores de E_a en el rango 4-38 °C para deterioro de AMT fueron 54,9 y 53,1 kJ/mol para sauco y cassis respectivamente y para a^* los valores fueron 62,6 y 86,0 kJ/mol. El descenso más importante en el contenido de polifenoles se observó a 25 °C, con un remanente de 54 % para cassis y de 78% para sauco. El %CP aumentó notablemente durante el almacenamiento a 25 y 38°C. Los resultados mostraron un efecto significativo de la temperatura en la estabilidad de todos los parámetros estudiados.

Palabras clave: antocianinas, color, cassis, sauco, cinética de almacenamiento.

ABSTRACT

During storage of products based on berries, compounds as anthocyanins and color, are affected. The aim of this work was to study the changes in these parameters and study the kinetics of degradation during storage at 4, 25 and 38°C. Content of monomeric anthocyanins (AMT), percentage of polymeric colour (% CP), colour parameters in the CIELab space and total polyphenol content (PT) were measured. The kinetics of degradation of AMT and parameter a^* were adjusted with a first-order model. AMT degradation rates were higher than for a^* indicating greater color stability compared with AMT. E_a values within the range 4-38°C for deterioration of AMT were 54.9 and 53.1 kJ/mol for elderberry and cassis and for a^* were 62.6 and 86.0 kJ/mol. The most important decrease in polyphenol content was observed at 25°C, with a remanent of 54% and 78% for cassis and elderberry. The %CP increased significantly during storage at 25 and 38°C. The results showed a significant effect of temperature on the stability of all parameters studied.

Keywords: anthocyanins, color, elderberry, blackcurrant, storage kinetics

INTRODUCCIÓN

Los *berries* contienen una gran cantidad de compuestos químicos denominados polifenoles (antocianinas, flavonoides entre otros), valorados por sus propiedades antioxidantes y su intenso color. En numerosos estudios se los ha asociado a su acción para retardar los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células y a la inhibición de las enfermedades provocadas por el daño oxidativo (Brownmiller et al. 2008). El consumo de estas frutas se da, además de como fruta fresca, en forma de productos basados en ellas como jugos, salsas, conservas, mermeladas entre otros. Estos productos reciben en general un tratamiento térmico con el objetivo principal de inactivar enzimas presentes naturalmente en las frutas, como polifenoloxidasas o peroxidasa (Sadilova et al. 2009). Luego son almacenados refrigerados o a temperatura ambiente, según su estabilidad debida a factores como pH, concentración de sólidos solubles, presencia de conservantes, tipo de envase, etc. Durante el almacenamiento, el contenido de compuestos bioactivos y el color se ven afectados. Este aspecto debe considerarse al determinar la vida útil de los productos, sobre todo teniendo en cuenta que en alimentos ácidos suele ser relativamente larga, por ejemplo, de 2 años a temperatura ambiente.



La determinación de parámetros cinéticos del deterioro durante el almacenamiento puede ser de utilidad para predecir los cambios en la composición y color de los productos y determinar sus características al final de la vida útil. En estudios previos se han reportado los efectos del almacenamiento en la degradación de antocianinas y los parámetros cinéticos asociados en frutas y otros vegetales que contienen estos compuestos en jugos, conservas y purés (Kirca et al., 2006 y 2007, Brownmiller et al. 2008).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios en el color, contenido de antocianinas totales y polifenoles y determinar parámetros cinéticos como Energías de Activación (E_a), Q_{10} y tiempos medios de reacción en pulpas de cassis (*Ribes nigrum*) y sauco (*Sambucus nigra*), durante el almacenamiento entre 4 y 38°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Almacenamiento de las pulpas

Las pulpas de fruta pasteurizadas y congeladas de cassis y sauco fueron provistas por un productor de El Bolsón, Río Negro. Se fraccionaron en envases de polietileno-poliámida, se cerraron herméticamente y se almacenaron a temperaturas constantes de 4, 25 y 38°C. A diferentes intervalos de tiempo se retiraron muestras por duplicado para la realización de los análisis.

Obtención de extractos alcohólicos

Se prepararon extractos alcohólicos a partir de 5g de pulpa de cada fruta. Las muestras fueron extraídas dos veces con 20ml de etanol: HCl 0.1N (85:15) (Merck, Alemania), luego centrifugadas y los sobrenadantes fueron mezclados y utilizados para mediciones de polifenoles totales, antocianinas monoméricas, color, densidad de color y color polimérico. La expresión de los resultados se refirió a la pulpa inicial considerando las densidades correspondientes.

Polifenoles Totales

La concentración de polifenoles totales se determinó por un método colorimétrico usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania), según Waterhouse (2001). En el ensayo realizado a 20°C se utilizaron 0.020 ml de las diluciones adecuadas de los extractos alcohólicos de las pulpas. Se leyó la absorbancia a 765nm en un espectrofotómetro PG Instruments T60U UV-Vis (Reino Unido). La concentración de polifenoles totales se calculó a través de una curva de calibración de ácido gálico (Anedra, Argentina), y se expresó como equivalentes de ácido gálico g equiv de gál/L pulpa.

Antocianinas monoméricas

El contenido de antocianinas monoméricas de los extractos alcohólicos de las pulpas de cada fruta, fue determinado por el método de pH diferencial según Giusti y Wrolstad (2001), usando buffer cloruro de potasio pH 1 y buffer acetato de sodio pH 4.5. Las muestras de los extractos alcohólicos fueron mezcladas y diluídas adecuadamente en el buffer correspondiente y su absorbancia medida a 510 y 700 nm. El contenido de antocianinas monoméricas se expresó como cianidin-3-glucósido en mg/L de acuerdo con la siguiente ecuación (1):

$$AMT \text{ (mg/L)} = A \cdot M \cdot FD \cdot 1000 / (\epsilon \cdot l) \quad (1)$$

donde $A = [(A_{510} - A_{700})_{pH 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4.5}]$; M (peso molecular) = 449.2 g/mol para el cianidin-3-glucósido; FD = factor de dilución, $\epsilon = 26900$ es el coeficiente de extinción molar en L/mol/cm; $l = 1$ es el camino óptico en cm.

Densidad de color, Color polimérico y Porcentaje de Color polimérico

La determinación de la densidad de color y del porcentaje de color polimérico fue realizada según el método de Giusti y Wrolstad (2001). Dos réplicas de cada muestra de los extractos alcohólicos de las pulpas, fueron tratadas ya sea con una solución de metabisulfito de potasio para su blanqueo o con agua como control. Se midió la absorbancia en cada una a 420, 510 y 700 nm. La densidad de color (DC) fue calculada usando la muestra control y según la siguiente ecuación (2), siendo FD el factor de dilución del extracto para las ecuaciones (2) y (3).

$$DC = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})] \cdot FD \quad (2)$$

El color polimérico (CP) fue determinado usando la muestra blanqueada y de acuerdo con la ecuación (3)

$$CP = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})] \cdot FD \quad (3)$$



El porcentaje de color polimérico (% CP) fue calculado según la ecuación (4).

$$\% \text{ CP} = (\text{CP} / \text{DC}) \cdot 100 \quad (4)$$

Color

El color de las pulpas fue analizado con un espectrofotómetro Minolta CM-600d (Konica Minolta Sensing Inc., Japón), usando el iluminante D65 y un ángulo del observador de 2° (CIE 1931 Standard Observer). Las mediciones de color se hicieron sobre 1 ml de extracto alcohólico, en cápsulas de plástico blanco de 3 cm de diámetro. Se midieron los parámetros de la escala tridimensional CIELab: L* para luminosidad, a* para el color rojo y b* para el amarillo. Los valores se expresaron como L, C*_{ab} para Chroma ($a^{*2}+b^{*2}$)^{1/2}, h⁰ para el ángulo Hue (arctang b/a).

Análisis de datos

Se analizaron réplicas de cada pulpa almacenada para cada tiempo de ensayo. Todos los parámetros estudiados se determinaron al menos por duplicado y se informó su promedio ± error estándar. Se realizaron correlaciones de Pearson entre el contenido total de antocianinas monoméricas (AMT), y el parámetro de color a* (P<0,05) de los extractos alcohólicos de las pulpas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución de antocianinas monoméricas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante durante el almacenamiento

En la **Figura 1** se observa la evolución de las antocianinas monoméricas totales (AMT) a las tres temperaturas de almacenamiento (4, 25 y 38 °C) para las pulpas de sauco y cassis.

Partiendo de un valor inicial promedio de AMT en las pulpas pasteurizadas 706,6 mg/L para sauco y de 1291,53 mg/L para cassis, se observó un descenso en el contenido a todas las temperaturas de almacenamiento, aunque este descenso fue más marcado para el cassis. A modo comparativo, cumplido los 45 días de almacenamiento, en la pulpa de sauco el porcentaje de disminución fue de 32%, 67% y 98% a 5, 25 y 38°C respectivamente y para cassis de 46%, 80% y 97% en ese mismo orden. Esto indica que a la temperatura de 38°C casi no se detecta contenido residual de AMT al final del almacenamiento para ambas frutas. Previamente se han reportado resultados similares para jugos de arándano almacenados durante 6 meses, observando una pérdida de 68% de antocianinas monoméricas a 25°C. En arándanos enlatados se observó una pérdida de hasta 71% luego de 6 meses. (Brownmiller 2008).

El contenido de polifenoles totales (PT) mostró una mayor estabilidad durante el almacenamiento a las tres temperaturas estudiadas. El valor inicial de PT medido para sauco fue de 5731±21 mg. ac. gálico/L, a 4°C se observó un remanente del 85% luego de 60 días (4924±34 mg. ac. gálico/L) y a 38°C se observó un valor mayor luego del almacenamiento (de 7203±32 mg. ac. gálico/L). En el caso del cassis, el contenido inicial fue de 7049±54 mg. ac. gálico/L, a 5°C se observó una retención de 92% luego de 60 días (6456±57 mg. ac. gálico/L), a 38°C se observó una retención del 84% (5926±67 mg. ac. gálico/L). A 25°C se observó una retención de PT de 78% para sauco a los 50 días de almacenamiento, y para cassis del 54%, mostrando en este caso un mayor descenso.

La disminución en el contenido de antocianinas monoméricas podría ser atribuido a reacciones de condensación con ácido ascórbico, reacciones de hidrólisis y pardeamiento no enzimático (Sadilova et al 2009). A pesar de la disminución en AMT, el contenido en PT fue bastante estable hasta el final del almacenamiento. Este comportamiento podría asociarse a la formación de compuestos de condensación o polímeros formados que contribuyen al contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante por lo que el nivel residual de estos parámetros suele ser relativamente alto (Chaovanalikit y Wrolstad 2004).



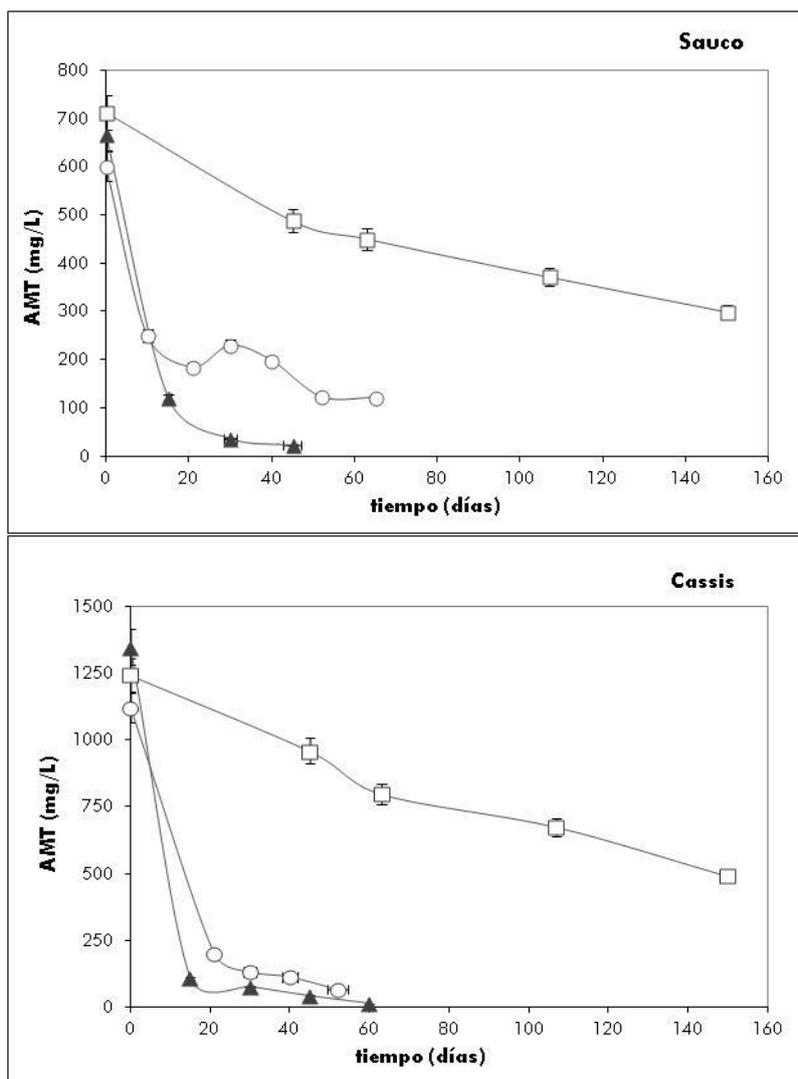


Figura 1. Evolución de las AMT durante el almacenamiento a las diferentes temperaturas 4° (□), 25°(O) y 38° (▲) de las pulpas de sauco y cassis.

Las diferencias en los valores totales y residuales de AMT y PT obtenidos para cassis y sauco pueden deberse a diferencias en el perfil de antocianinas y polifenoles de cada fruta, y en su estabilidad durante el almacenamiento. El cassis contiene como antocianinas mayoritarias la delfinidin 3-rutinosido, cianidin 3-rutinosido, delfinidin 3-glucosido y cianidin 3-glucósido (Jacobek et al 2007). Además, se ha determinado en esta fruta un contenido importante de proantocianidinas (Obón et al, 2011, Mattila et al., 2011), asociadas a fenómenos de estabilización del color. En un estudio de almacenamiento de extractos alcohólicos de jugos de cassis, se observó una mayor estabilidad para almacenamiento de delfinidin y cianidin 3-rutinósidos que para las otras antocianinas, observándose una disminución del 25 % luego de 12 meses a 8°C (Rubinskiene et al, 2005).

En el sauco, las antocianinas mayoritarias son cianidin 3-sambubiosido-5-glucosido, cianidin 3 glucosido, cianidin 3- sambubiosido y cianidin 3-rutinosido (Jacobek et al 2007). Se ha reportado una mayor estabilidad de antocianinas derivadas de cianidin, sobre otro tipo de antocianinas en jugos de arándano, que en el caso del sauco serían las mayoritarias (Trost et al., 2008).

En ambas frutas se ha observado la presencia de ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzénicos y antocianinas acetiladas, que podrían mejorar la estabilidad del color por participar en fenómenos de copigmentación inter o intramolecular (Giusit y Wrolstad, 2003, Rein 2005). Como se mencionó anteriormente, si bien se detecta una disminución en el contenido de AMT, estos compuestos formados podrían contribuir a la apreciación del color y al contenido de polifenoles totales determinado luego del almacenamiento.



Evaluación del color durante el almacenamiento entre 4 y 38°C.

El color se evaluó sobre los extractos alcohólicos de las muestras almacenadas a las diferentes temperaturas de almacenamiento. La evolución de los parámetros de color se muestra en **Figura 2**. Ambas frutas presentaron un comportamiento similar para cada temperatura de estudio.

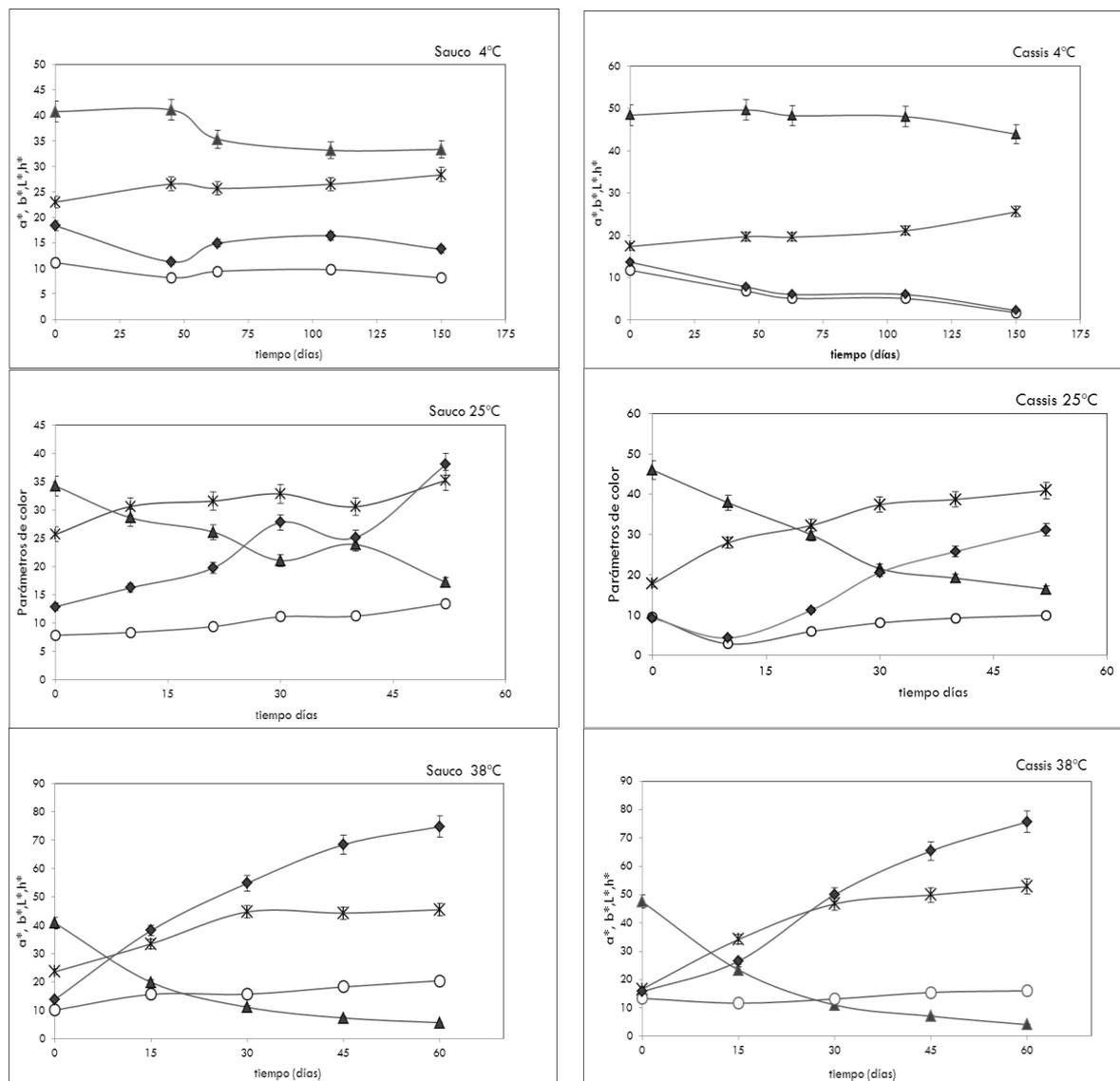


Figura 2. Cambios en los parámetros de color L (*), a (\blacktriangle), b (\circ), h (\blacklozenge) evaluados en los extractos alcohólicos de las muestras de sauco y cassis almacenadas a 4°C, 25°C y 38°C.

A 4°C, en ambas pulpas se observó un descenso en el parámetro a* que no superó el 12% (a* inicial: 38 para sauco y 48 para cassis). En el caso del cassis se observó un descenso de los parámetros b* y h°. A temperaturas de 25°C y 38°C, los parámetros de color se comportaron en forma similar para ambas frutas. Se observó un aumento de L* (asociado a la luminosidad) a mayor temperatura de almacenamiento: a 38°C, aumentó un 68% (L* inicial: 17, L* final: 53) en el cassis y 48% (L* inicial: 24, L* final: 45) en el sauco.

El parámetro a* sufrió un descenso marcado para el cassis a 38°C (a* inicial: 48, a* final: 4) y un aumento en el parámetro b*. En el caso del sauco se observó un comportamiento muy similar con un descenso de a* y aumento en b*.

Estos cambios se vieron reflejados en la variación del parámetro h° tanto en sauco como en cassis a 38°C, obteniéndose valores de 13,7 hasta 74,7 en el caso del sauco y de 15,7 hasta 75,6 para el cassis (a tiempo inicial y final respectivamente).

A 25°C también se observó un aumento neto en los valores de h°, de un 66% en el caso de sauco y de un 77% para el cassis.



Se obtuvo una buena correlación al analizar el comportamiento de la degradación de AMT y color (parámetro a*) a las distintas temperaturas de almacenamiento. Aunque el rango de variación del coeficiente de correlación fue de 0,70 a 0,96 (P<0,05) (**Tabla 1**), ambas frutas presentaron un coeficiente global similar.

Tabla 1. Correlaciones entre el contenido total de antocianinas monoméricas (AMT), y parámetro de color a* a diferentes temperaturas de almacenamiento para las pulpas de sauco y cassis.

Temperatura de almacenamiento	Relación de AMT-a*			
	SAUCO		CASSIS	
	Coeficiente de correlación	Coeficiente global	Coeficiente de correlación	Coeficiente global
38°C	0,96	0,868	0,93	0,862
25°C	0,83		0,95	
4°C	0,82		0,70	

Los valores del %CP (asociado a la formación de compuestos poliméricos) fueron mayores para sauco que para cassis a tiempo inicial. En promedio se observó un valor de %CP de 49,3 para sauco y de 19,7 para cassis. Al final del almacenamiento se observó un aumento en el % de CP a todas las temperaturas de almacenamiento.

La relación de %CP entre los valores finales y los iniciales fueron para cassis de 2, 13 , 2,75 y de 4,64 a 4, 25 y 38°C respectivamente, y para sauco las relaciones fueron de 1,62 , 2,21 y 1,82 para las mismas temperaturas. Estos resultados indican que para el cassis el almacenamiento tuvo un mayor efecto sobre la formación de compuestos poliméricos, sobre todo a 38°C. En la **Figura 3** se observa la evolución de %CP para sauco y cassis a 25°C.

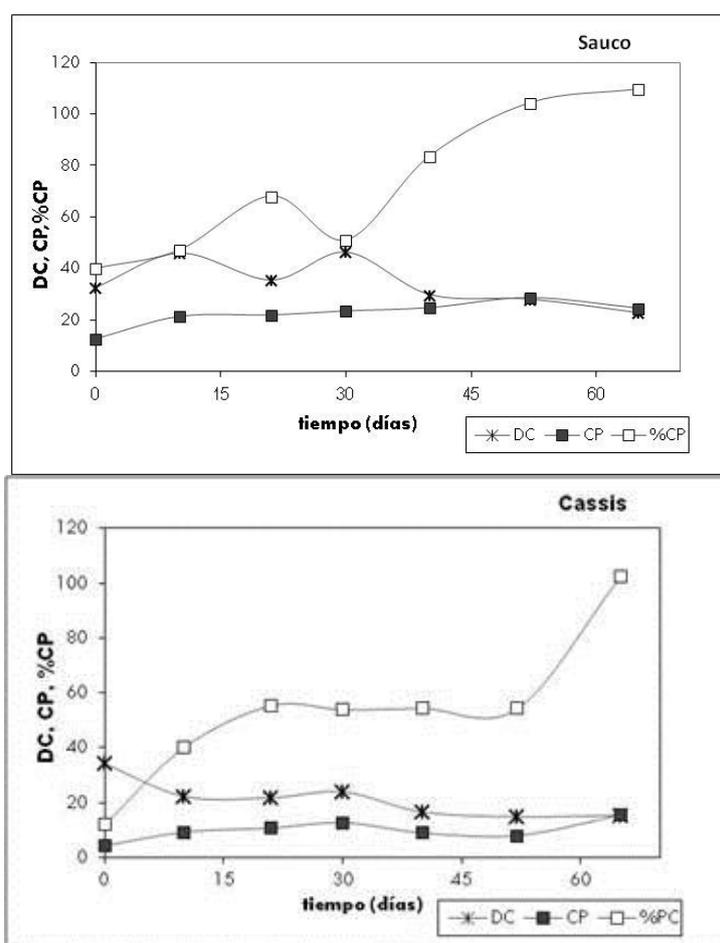


Figura 3. Evolución de los índices de color: densidad de color (DC), color polimérico (CP) y porcentaje de color polimérico (% CP) durante el almacenamiento de pulpas de sauco y cassis a 25°C.



Parámetros de la cinética de degradación durante el almacenamiento

Las cinéticas de degradación de AMT y del parámetro a^* de color se ajustaron adecuadamente con un modelo de reacción de primer orden (Kirka et al, 2007) como se observa en la **Figura 3** para 5 y 38°C. Se calculó la constante de degradación, k y el tiempo medio de reacción, $t_{1/2}$ para la degradación de antocianinas y color según las siguientes ecuaciones:

$$\ln(C/C_0) = -k_{AMT} \cdot t \quad (5)$$

$$\ln(C/C_0) = -k_a \cdot t \quad (6)$$

siendo:

C_0 : concentración de antocianinas (AMT) y valor de a^* al tiempo inicial

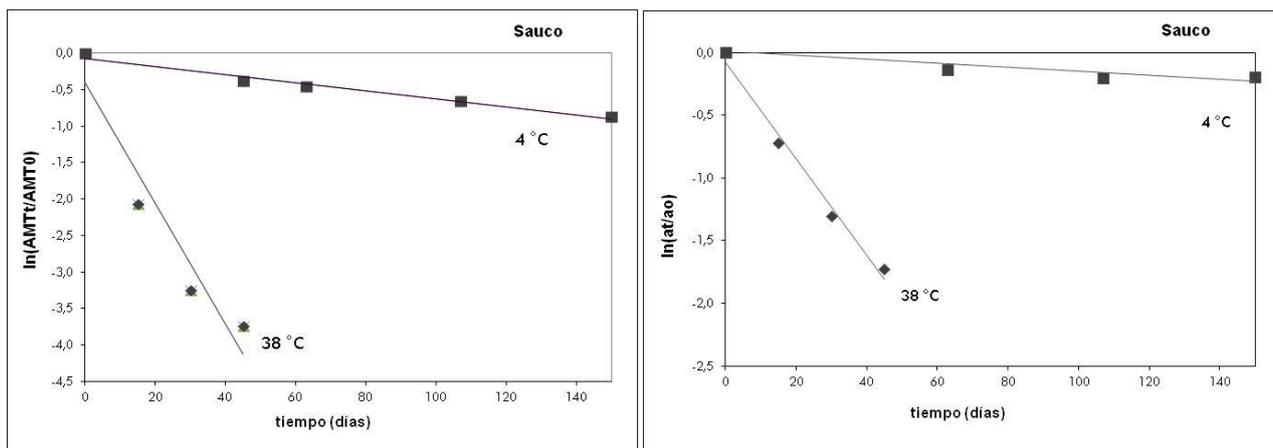
C : concentración de antocianinas (AMT) y valor de a^* después de un tiempo t de almacenamiento a una dada temperatura

$$t_{1/2} = -\ln 0,5 \cdot k^{-1} \quad (7)$$

$t_{1/2}$: tiempo medio de reacción, en el que se alcanza el 50% de la degradación del parámetro analizado.

En la **Tabla 2** se muestra los parámetros cinéticos obtenidos a las diferentes temperaturas. Tanto para las velocidades de degradación de AMT y de color a^* se observó un aumento con la temperatura de almacenamiento conjuntamente con una disminución en los tiempos medios de degradación.

En cuanto a la degradación del parámetro de color a^* presenta una disminución más lenta que la correspondiente a las antocianinas monoméricas totales. La relación entre k_{AMT} / k_{a^*} fue para el sauco de 3,5 a 4°C, 2,7 a 25°C y de 2,5 a 38°C. Para el cassis la relación k_{AMT} / k_{a^*} fue de 7,6 a 4°C, 2,3 a 25°C y de 1,73 a 38°C.



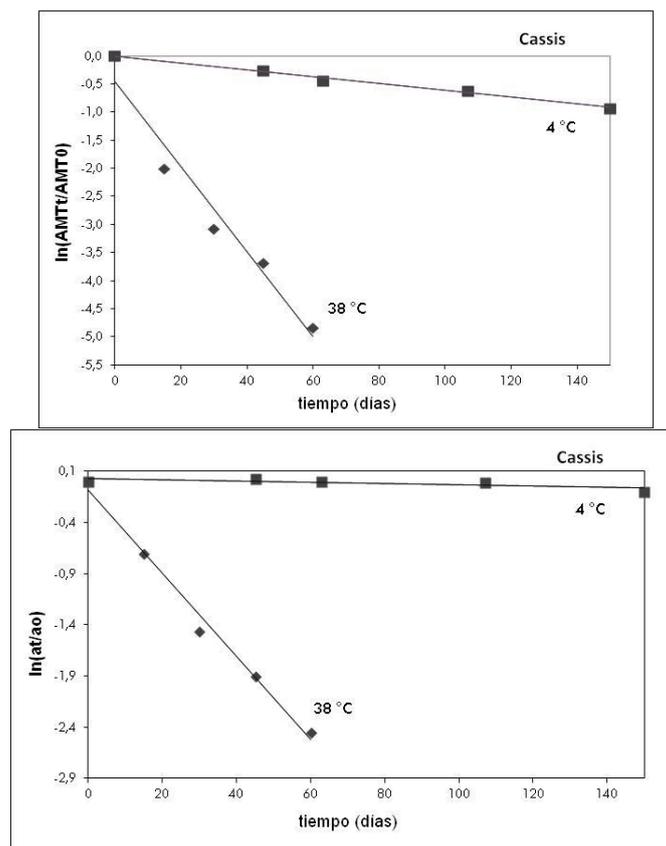


Figura 4. Cinética de degradación de las antocianinas monoméricas totales (AMT) y el parámetro de color a^* color en función del tiempo de almacenamiento a 4°C y 38°C, en pulpas naturales de sauco y cassis.

En la **Tabla 2**, se muestran también los valores de Q_{10} entre 25-38°C de ambos parámetros en las dos frutas. Los valores indican que en el rango de temperaturas entre 25-38°C la velocidad de degradación aumenta aproximadamente 3 veces por cada 10 grados de aumento de temperatura para el cassis, y para el sauco la velocidad aumenta entre 1,5 y 1,85 veces por cada 10 °C.

La dependencia con la temperatura se analizó también en función de los valores de Energías de activación (E_a) en el rango de temperatura estudiado según modelo de Arrhenius. Los valores de E_a obtenidos demuestran una dependencia similar con la temperatura para los procesos mencionados obteniendo valores de 54,9 kJ/mol para la degradación de AMT y de 62,2 kJ/mol para la degradación de a^* en el sauco, y 53 kJ/mol y 86 kJ/mol respectivamente para el cassis.

Como puede observarse en los resultados obtenidos, las velocidades de degradación de los parámetros de color fueron más bajas que las de degradación de antocianinas, sin embargo, en ambos parámetros se observó un notorio descenso, además mostraron buena correlación durante el almacenamiento.

El aumento en el %CP indicaría una mayor importancia de compuestos amarrados sobre el total de los antocianos presentes. Un aumento en el porcentaje de color polimérico podría reflejar la degradación de compuestos monoméricos por formación de compuestos de condensación y otros compuestos poliméricos, que seguirían siendo detectados por el método de Folin, contribuyendo al contenido medido de Polifenoles Totales (Patras et al 2010). Este fenómeno podría explicar la mayor estabilidad de los PT durante el almacenamiento.

Estas observaciones son consistentes con el aumento del parámetro cromático h^* (asociado al tono del color) y la observación visual de tonos amarrados. Chaovanalikit y Wrolstad (2007) reportaron un descenso del 69% de las antocianinas monoméricas totales en frutillas enlatadas y un aumento en el %CP de 7% a 33% luego de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente. También se reportó un aumento de 13 a 40 % en cerezas enlatadas. (Chaovanalikit and Wrolstad 2004). En puré de arándano se observó un aumento de 1 a 42% luego de 6 meses de almacenamiento (Brownmiller 2008).



Tabla 2. Parámetros de cinética de degradación para antocianinas y el parámetro de color a^* en pulpas de sauco (a) y cassis (b).

a) Sauco

Temperatura	4°C	25°C	38°C
k (AMT)	0,0056	0,0201	0,0826
k (a^*)	0,0016	0,0074	0,0333
$t_{1/2}$ AMT	123,75	34,48	8,39
$t_{1/2}$ (a^*)	433,13	93,65	20,81
E_a (AMT)	54,9 kJ/mol		
E_a (a^*)	62,2 kJ/mol		
$Q_{1025-38^\circ\text{C}}$ (AMT)	2,96		
$Q_{1025-38^\circ\text{C}}$ (a^*)	3,18		



b) Cassis

Temperatura	4°C	25°C	38°C
k (AMT)	0,0061	0,0421	0,0710
k (a*)	0,0008	0,0183	0,0406
t _{1/2} AMT	113,61	16,46	9,76
t _{1/2} (a*)	790,19	37,87	17,07
E _a (AMT)	53,1 kJ/mol		
E _a (a*)	86,0 kJ/mol		
Q ₁₀ 25-38 °C AMT	1,49		
Q ₁₀ 25-38 °C a*	1,85		

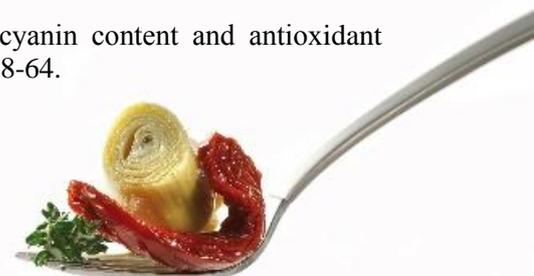
En cuanto a los parámetros de las cinéticas de almacenamiento, se han reportado previamente energías de activación similares para el deterioro de antocianinas en otras frutas y vegetales: Kirca y Cemeroğlu (2003) reportaron valores de 73,2 kJ/mol en almacenamiento de concentrados de naranja sangre entre 4 y 37°C, también se reportaron valores de entre 65,9 y 94,7 kJ/mol para jugo de zanahoria “negra” agregado a otras frutas como uva, manzana, limón, naranja (Kirca et al 2006). También se reportaron valores de Q₁₀ similares para el deterioro de antocianinas, por ejemplo de entre 2,3 y 3 para extractos de zanahoria negra almacenada entre 4-37 °C (Kirca et al 2006).

CONCLUSIONES

Los resultados indican un efecto significativo de la temperatura en la estabilidad de todos los parámetros estudiados. Se observó una mayor estabilidad de todos los parámetros estudiados a 4°C, mientras que a 25 y 38°C la disminución en antocianinas monoméricas y parámetro a* fue muy notoria. Sin embargo, se observó una buena retención de polifenoles totales al final del almacenamiento. Esto indicaría una mayor conveniencia de almacenamiento de las pulpas pasteurizadas a temperaturas de refrigeración. Los parámetros cinéticos determinados pueden ser de utilidad para determinar el contenido de compuestos bioactivos y color para una dada vida útil de los productos basados en estas pulpas.

BIBLIOGRAFÍA

- Brownmiller C., Howard LR, Prior RL. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric colour and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73: H72-79.
- Chaovanalikit A, Wrolstad RE. 2004. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 69: 67-72.
- Giusti MM, Wrolstad RE. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. En: Wrolstad R, Acree T, An H, Decker E, Penner M, Reis D, Schawrtz S, Shoemaker C, Spoms P, editores. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (1st.edn). New York: John Wiley and Sons, Inc. F1.2.1
- Giusti M, Wrolstad R. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 217-225.
- Jacobek L, Seruga M, Medvidović-Kosanović M, Novak I. 2007. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103: 58-64.



- Kirca, A, Ozkan M, Cemeroglu B. 2003. Thermal Stability of black carrot anthocyanins in blond orange juice. *Journal of Food Quality*, 26:361-366.
- Kirca A, Özkan M, Cemeroglu B. 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97: 598–605.
- Kirca A., Özkan M., Cemeroglu B. Effects of temperature solid content and pH on stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*. 2007; 101: 212-218.
- Mattila P, Hellström J, McDougall G, Dobson G, Pihlava, J-M, Tiirikka T, Stewart D, Karjalainen, R. 2011. Polyphenol and vitamin C contents in European commercial blackcurrant juice products. *Food Chemistry*, 127:1216-1223.
- Obón JM, Díaz García MC, Castellar MR. 2011. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 760- 771.
- Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 3-11.
- Rein MJ. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (dissertation). EKT series 1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. Pag. 1-88.
- Rubinskiene M, Viskelis P, Jasutiene I, Viskeliene R, Bobinas C. 2005. Impact of various factor son the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International*, 38: 867-871.
- Sadilova E, Stintzing F, Kammerer D, Carle R. 2009. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42 : 1023-1033.
- Trošt A, Golc-Wondra A, Prošec M, Milivojevič L. 2008. Anthocyanin degradation of Blueberry–Aronia nectar in glass compared with carton during storage. *Journal of Food Science: Sensory and Food Quality*, 73: 406-411.
- Waterhouse AL. 2001. Determination of total phenolics. En: Wrolstad RE, editor. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley & Sons. Pag. I1.1.1

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Frutas del Sur Andino S.A. (Río Negro, Argentina) por haber donado las pulpas de fruta utilizadas en el presente estudio.



Elaboración y caracterización de películas comestibles elaboradas a partir de emulsiones acuosas de pectina y ceras de girasol

Chalapud M.C., Bäumler E.R., Carelli A.A.

Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI, UNS-CONICET), Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Camino Carrindanga Km 7, Bahía Blanca, Argentina
e-mail: mchalapud@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

La elaboración de películas comestibles a partir de emulsiones compuestas por hidrocoloides y lípidos surge de la asociación de estos dos materiales para formar una matriz estructurada con buenas propiedades mecánicas y baja transferencia de vapor de agua. El presente trabajo expone la elaboración de películas comestibles a partir de pectina de bajo metoxilo, ceras de girasol y glicerol (plastificante), evaluando su estructura, resistencia al agua y determinando su comportamiento térmico. Las emulsiones se elaboraron hidratando pectina de bajo metoxilo en concentraciones de 1, 2 y 3% m/m, adicionando 4 g de plastificante (glicerol) y ceras de girasol en tres proporciones: 0,1, 0,2 y 0,3 g de cera/g de pectina. Las películas fueron elaboradas por el método casting, agregando CaCl_2 para formar una red de pectinato de calcio. Los valores de espesor, índice de swelling, absorción de agua y permeación de vapor de agua de las películas fueron influenciados significativamente por el contenido de ceras. Las imágenes obtenidas por SEM revelaron la presencia de ceras depositadas principalmente en la superficie. Fue posible elaborar películas flexibles y adecuadas para manipular a partir de emulsiones de pectina y ceras de girasol, obteniéndose datos de interés para su aplicabilidad como películas comestibles.

Palabras clave: Películas, pectina, ceras de girasol, emulsiones

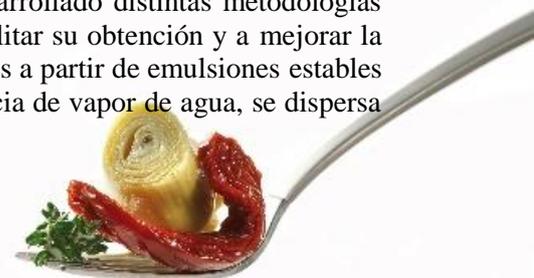
ABSTRACT

The development of edible films from emulsions composed of hydrocolloids and lipids emerges from the association of these two materials to form a structured matrix with good mechanical and low water vapor transfer properties. This paper presents the development of edible films from low methoxyl pectin, sunflower waxes and glycerol (plasticizer); evaluating its structure, water resistance and thermal behavior. The emulsions were prepared by hydrating low methoxyl pectin at concentrations of 1, 2 and 3% wt/wt, by adding 4 g plasticizer (glycerol) and sunflower wax in three proportions: 0.1, 0.2 and 0.3 g of wax/g pectin. The films were prepared using the casting method, adding CaCl_2 to form a network of calcium pectinate. Thickness values, swelling index, water absorption and water vapor permeation of films were influenced significantly by the wax content. The images obtained by SEM revealed the presence of waxes mainly deposited on the surface. From pectin and sunflower wax emulsions, it was possible to develop flexible films suitable for handling. As result, relevant data to its applicability as edible films were obtained.

Keywords: Films, pectin, sunflower waxes, emulsions

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los materiales convencionales usados como envases primarios, pueden ser potencialmente sustituidos por películas comestibles (Debeaufort y Voilley 1995), cuyas propiedades funcionales dependen de la naturaleza y de las características complementarias del material formador, polisacáridos, proteínas, lípidos, etc., (Pérez-Gago y Krochta 2001). El objetivo principal de las películas es proteger al alimento de deterioros químicos y físicos como la oxidación, crecimiento microbiano, pérdida y/o cambio de aromas y sabores y deshidratación generados por la migración de vapor de agua, oxígeno, etileno, etc. Para lograr dicha protección es necesario analizar la interacción del alimento con el medio circundante y que la formulación incluya componentes capaces de complementarse. Se han desarrollado distintas metodologías para la elaboración de películas comestibles, todas ellas encaminadas a facilitar su obtención y a mejorar la calidad de las mismas. Una de ellas es la elaboración de películas comestibles a partir de emulsiones estables en donde el lípido, que aporta buenas propiedades de barrera a la transferencia de vapor de agua, se dispersa



y es atrapado en la matriz de soporte generada por proteínas o polisacáridos (Baümler et al. 2013). Esta metodología surge de la necesidad de complementar las propiedades de los materiales que brinden además de buena estructura, buenas propiedades mecánicas (Han 2005). En la formulación de películas comestibles destinadas al envasado de alimentos, el uso de polisacáridos como la pectina ha sido muy difundido, siendo una matriz polimérica adecuada dado que reduce la tensión interfacial entre fases hidrofílicas e hidrofóbicas (Leroux et al. 2003) y además posee características importantes como biodegradabilidad, biocompatibilidad, comestibilidad, gelificación, permeabilidad selectiva a los gases, etc. (Espitia et al. 2014). Por su parte, las ceras de girasol constituyen la fase lipídica que actúa como barrera a la transferencia de vapor de agua entre el alimento y el ambiente (Schultz et al. 1949). Los plastificantes como glicerol, sorbitol, etc., poseen la capacidad de controlar la formulación líquida y añadir flexibilidad y resistencia a las películas pero también pueden afectar de manera adversa su desempeño (Baldwin et al. 2011). Entre los métodos más usados para la elaboración de películas se encuentra el método de casting, el cual consiste en la disposición de una solución en una superficie plana y antiadherente, seguida de secado y posterior desprendimiento de la película formada (Espitia et al. 2014). Este método puede realizarse en batch o continuo, siendo el primero muy útil en la preparación de películas a escala laboratorio, mientras que el segundo es ampliamente usado a escala industrial. Para el desarrollo de películas usando pectina de bajo metoxilo, es indispensable el uso de un agente entrecruzante que permita la formación de una red de pectinato de calcio (Baümler et al. 2014). La adición de iones Ca^{+2} a la película, permite la formación de redes por interacción entre los bloques de ácido galacturónico, presentes en la pectina, con cationes divalentes, particularmente Ca^{+2} (Díaz-Rojas et al. 2004). La presencia de los iones Ca^{+2} , inducen la asociación de cadenas que constituyen las zonas de unión y son las responsables de la formación del gel (Braccini y Pérez 2001). La caracterización física, química y funcional de las películas obtenidas es de gran importancia dado que permite recopilar información acerca de las mismas y evaluar el beneficio de su aplicación, siendo la permeabilidad una propiedad clave de los materiales de envase que protegen alimentos, ya que generalmente se requiere que sean poco permeables a gases y vapores (Nguyen et al. 2001). Los análisis de estructura que permiten observar la morfología y distribución de los materiales, así como la evaluación de su desempeño respecto a la resistencia al agua y comportamiento térmico, son estudios cada vez más relevantes y frecuentes que brindan datos de valor en el campo de las películas comestibles.

El objetivo de este trabajo es la elaboración de películas comestibles a partir de pectina de bajo metoxilo, ceras de girasol y glicerol (plastificante), evaluando su estructura, resistencia al agua, y determinando su comportamiento térmico.



MATERIALES Y MÉTODOS

Pectina de bajo metoxilo (LM 104) fue provista por GENU® Pectin (Dinamarca). Las ceras de girasol se obtuvieron de la purificación de residuos de la etapa de winterizado de la industria aceitera. Glicerol provisto por Fisher Scientific (98-99% de pureza, reactivo grado analítico) fue usado como plastificante. CaCl₂ fue obtenido de J.T. Backer Inc. (Phillipsburg, NJ) (98-99% de pureza, reactivo grado analítico) y usado como material entrecruzante.

Elaboración de películas

Pectina de bajo metoxilo, en concentraciones de 1, 2 y 3% m/m, fue hidratada en agua destilada y calentada a 85°C (temperatura superior al punto de fusión de las ceras de girasol) en un baño de agua por 15min hasta disolución completa; se adicionaron 4g de plastificante y finalmente se añadieron las ceras de girasol en tres proporciones: 0,1; 0,2 y 0,3 g de cera/g de pectina. Todas las muestras fueron homogenizadas durante 10min a 12000 rpm, manteniendo la temperatura a 85°C. Aproximadamente 25 g de cada emulsión fueron vertidos dentro de cajas de Petri de 10,5 cm de diámetro y secadas a 50°C por 20 horas. Luego se agregó aproximadamente 30g de una solución 2% de CaCl₂; el calcio reacciona con el ácido galacturónico de la pectina, formando una red de pectinato de calcio. Una vez obtenidas, las películas se enjuagaron tres veces con agua destilada para eliminar restos de Ca y fueron separadas con cuidado de las cajas de Petri.

Las películas fueron almacenadas en desecadores sellados con humedad relativa controlada: 57% HR (solución saturada de NaBr) a 25°C.

Caracterización

El espesor de las películas se obtuvo usando un micrómetro digital. El mismo fue posicionado en cinco zonas de las películas (una central y cuatro periféricas). Para cada película se determinó el promedio del espesor y su respectiva desviación estándar. Este dato promedio fue usado para calcular la permeabilidad de vapor de agua.

El análisis de la microestructura de las películas elaboradas a partir de emulsiones de pectina y ceras de girasol fue realizado con un microscopio electrónico de barrido (LEO EVO 40XVP, Cambridge, 2004). Las muestras se fijaron a un cubreobjeto y se cubrieron con una delgada capa de oro en un dispositivo de pulverización catódica. Las imágenes digitales fueron obtenidas a 5.0 kV usando 2000x de magnificación. Se tomaron fotografías transversales y de la superficie superior de las películas.

Resistencia al agua

Índice de swelling (IS): Cada película fue cortada en círculos de 2,5 cm de diámetro, los cuales fueron pesados (m_i) y sumergidos en 100mL de agua destilada (25°C) en un sistema agitado durante 2 minutos. La muestra húmeda se secó cuidadosamente con un material absorbente para eliminar el exceso de agua de la superficie y se volvió a pesar (m_f). El índice de swelling fue calculado como:

$$IS (\%) = \frac{(m_f - m_i) * 100}{m_i} \quad (1)$$

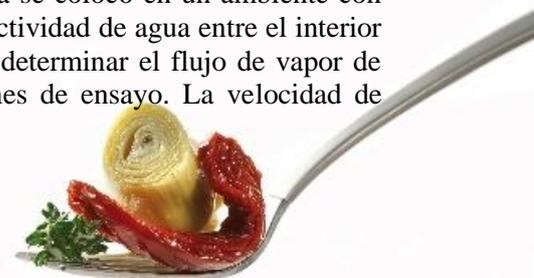
Se realizaron tres determinaciones independientes por cada película reportándose el valor promedio acompañado de su desviación estándar.

Absorción de agua (AG): La habilidad de los films para absorber agua fue determinada midiendo el peso ganado de la película (expresado en porcentaje) después de ser almacenada a 95% HR (usando una solución saturada de KNO₃ en agua destilada) en un desecador a 25°C por dos semanas. La cantidad de agua absorbida fue calculada como:

$$AG (\%) = \frac{(P_f - P_0) * 100}{P_f} \quad (2)$$

Donde P_0 es el peso de la muestra antes del experimento de absorción de agua y P_f es el peso después de dos semanas. Por cada película se efectuaron tres determinaciones independientes reportándose el valor promedio y su desviación estándar.

Velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) y Permeabilidad al vapor de agua (PVA): La transferencia de vapor de agua a través de la película se determinó de acuerdo al método ASTM E-96 (ASTM 1995); el mismo consistió en sellar herméticamente con la muestra de la película, la boca de una celda de permeación que contenía agua (HR= 100%). La celda se colocó en un ambiente con temperatura y humedad relativa controladas generando así un gradiente de actividad de agua entre el interior y exterior de la celda. El peso de la celda se registró periódicamente para determinar el flujo de vapor de agua a través de la película, hasta alcanzar el equilibrio en las condiciones de ensayo. La velocidad de



transmisión de vapor de agua (VTVA) se obtuvo de la pendiente de la recta obtenida mediante una regresión lineal de los datos experimentales del peso de la celda en función del tiempo (Ec. 3) y la permeabilidad de vapor de agua (PVA) se determinó por la Ec. 4.

$$VTVA = \frac{P}{t \cdot A} \quad (3)$$

$$PVA = \frac{VTVA \cdot x}{\Delta P} \quad (4)$$

Donde P es el incremento en peso (g), t es la duración del experimento (días), A es el área de permeación (32,17 cm²), x es el espesor de la película (mm) y ΔP es la diferencia de presión de vapor de agua a ambos lados de la película (kPa). Los ensayos de PVA fueron realizados por duplicado.

Comportamiento térmico

Se realizó por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) empleando un equipo Perkin Elmer Pyris I (USA). Las muestras, entre 5 y 15 mg, se ubicaron en celdas de aluminio cerradas herméticamente. Las mismas se equilibraron a 25°C, manteniendo la temperatura por 2 min, luego se calentaron hasta 250°C a una velocidad de 10°C/min a fin de evaluar el comportamiento de fusión. Se realizaron dos ensayos independientes de cada muestra.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el valor medio de n determinaciones y fueron acompañados por su desviación estándar. Las diferencias significativas se analizaron mediante ANOVA doble y test de Fisher ($\alpha=0,05$). Se utilizó el software de análisis estadístico InfoStat Versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la medición del espesor de las películas se muestran en la **Tabla 1**. Los valores obtenidos estuvieron entre 56,4 y 358,8 μ m. Para las películas elaboradas con 1 y 2% m/m de pectina, aunque se observó una tendencia de aumento del espesor promedio a medida que la proporción de ceras incrementó, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas. En cambio, las películas elaboradas con 3% m/m de pectina y proporciones de cera 0,2 y 0,3, presentaron un incremento significativo del espesor con respecto a la elaborada con una proporción de cera de 0,1 indicando que a este nivel de pectina, el agregado de ceras contribuye significativamente en el espesor de las películas. Es importante resaltar que las películas obtenidas con concentraciones de 1 y 2% m/m de pectina fueron más flexibles y más adecuadas para trabajar que las elaboradas con 3% m/m.

Tabla 1. Espesor de las películas (μ m).

Pectina (% m/m)	Proporción de ceras de girasol (g ceras/g pectina)		
	0,1	0,2	0,3
1	56,4 \pm 17,1 ^a	64,2 \pm 17,7 ^a	70,3 \pm 20,9 ^a
2	119,2 \pm 27,1 ^a	134,6 \pm 67,7 ^a	158,5 \pm 71,7 ^a
3	140,3 \pm 29,4 ^a	296,9 \pm 83,8 ^b	358,8 \pm 110,6 ^b

Valores medios \pm desviación estándar, n=5.

Valores en la misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05)

La microestructura de las películas pudo ser observada mediante imágenes obtenidas por SEM. Las fotografías tomadas de la superficie de arriba de las películas (la superficie en contacto con el aire en el secado) se muestran en la **Figura 1**. Las imágenes revelaron la presencia de ceras depositadas principalmente en la superficie superior, observándose una tendencia de migración de las ceras debido a la diferencia de densidad entre ellas y los otros componentes de la película. En las películas con la proporción más baja de cera (proporción 0,1 g ceras/g pectina) se observaron algunas grietas, mientras que en aquellas elaboradas con las proporciones más altas pudo notarse la presencia de cúmulos de ceras.



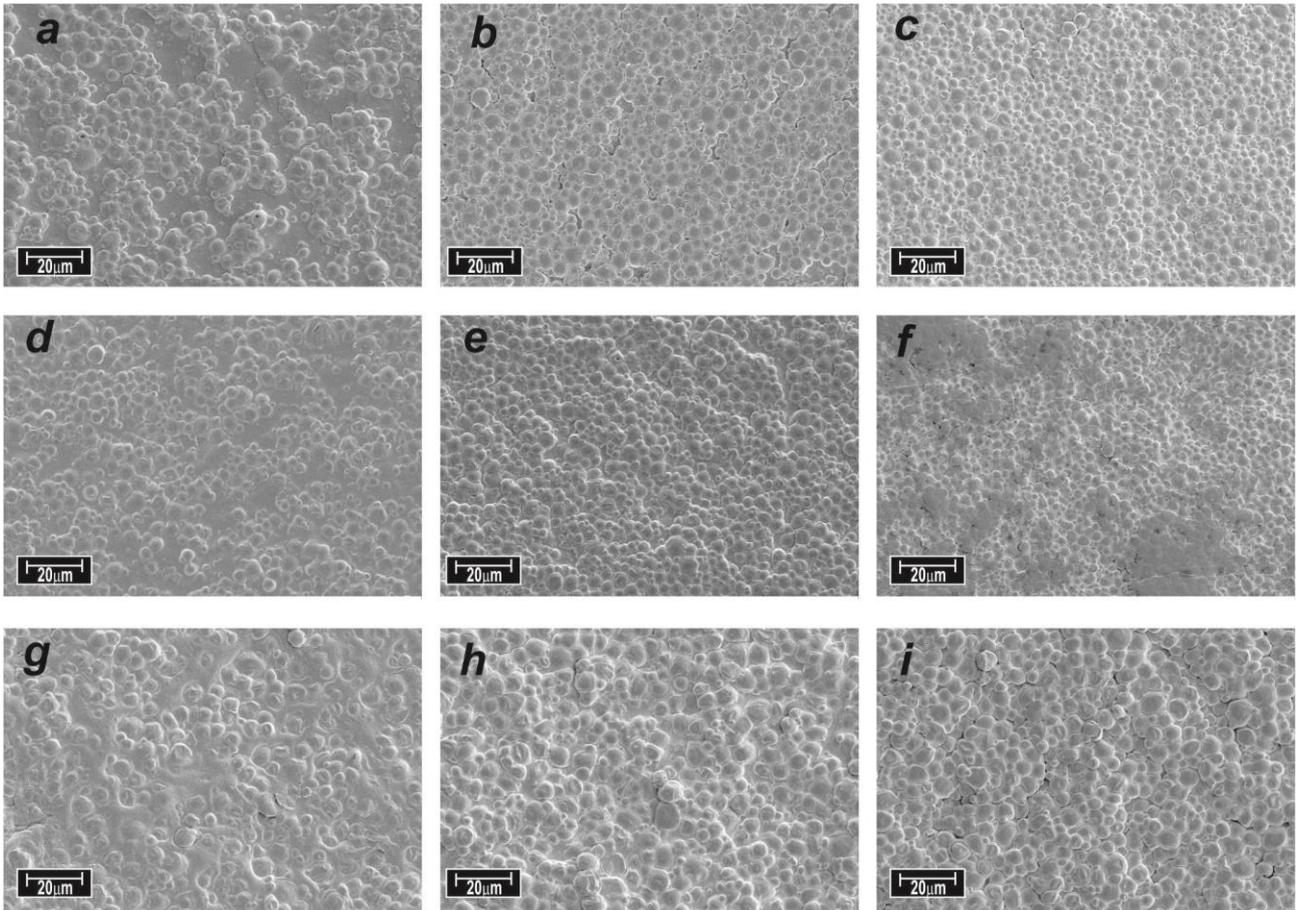


Figura 1. Fotografías SEM de las películas. Superficie superior. % m/m pectina – proporción de ceras a) 1 - 0,1; b) 1 - 0,2; c) 1 - 0,3; d) 2 - 0,1; e) 2 - 0,2; f) 2 - 0,3; g) 3 - 0,1; h) 3 - 0,2; i) 3 - 0,3.

En la **Figura 2** se presentan las imágenes SEM de las películas tomadas de forma transversal, observándose que a medida que la cantidad de ceras aumenta, además de depositarse en la superficie de arriba, también logran dispersarse y distribuirse en zonas del medio y abajo. Dicha dispersión del lípido en el espesor de la película contribuiría a mejorar características de permeabilidad y resistencia al agua ya que de esta manera, el camino por recorrer de las moléculas de agua que atraviesan la película es más difícil. Por lo tanto se brinda una mejor barrera, característica que es atribuida a las ceras de girasol.



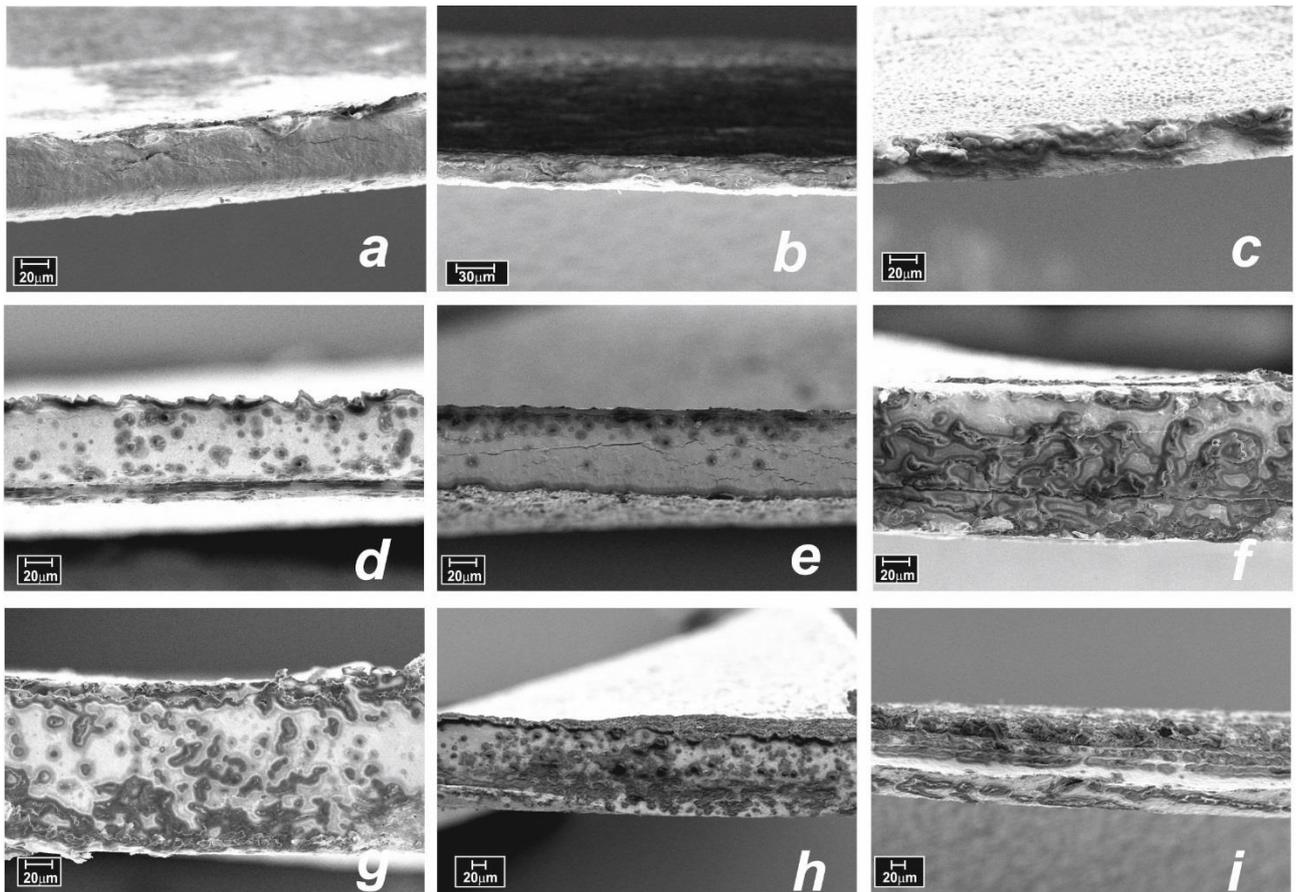


Figura 2. Fotografías SEM de las películas. Transversal. % m/m pectina – proporción de ceras a) 1 - 0,1; b) 1 - 0,2; c) 1 - 0,3; d) 2 - 0,1; e) 2 - 0,2; f) 2 - 0,3; g) 3 - 0,1; h) 3 - 0,2; i) 3 - 0,3.

Los resultados de análisis de resistencia al agua como son el índice de swelling (IS%) y la absorción de agua (AG%) de las películas se muestran en las **Tablas 2 y 3** respectivamente. Con el incremento en la proporción de ceras, los valores de IS presentaron una tendencia de aumento en películas con 1% m/m de pectina, cuyo comportamiento es contrario a lo encontrado en películas con 2 y 3% m/m de pectina, en donde se evidencia una disminución. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas en valores de IS con la proporción más baja de ceras en los niveles de 1 y 2% m/m de pectina, mientras se observaron diferencias significativas en las tres proporciones de ceras en el nivel 3% m/m de pectina. Estos resultados indican que en las películas elaboradas con 1% m/m de pectina, el aumento en la cantidad de ceras promueve una mayor interacción entre el agua y la matriz polimérica y un incremento en el volumen de las mismas; contrario a lo que sucede en los niveles de pectina de 2 y 3% m/m en donde los valores de IS son más altos a bajas proporciones de ceras.



Tabla 2. Índice de swelling (%).

Pectina (% m/m)	Proporción de ceras de girasol (g ceras/g pectina)		
	0,1	0,2	0,3
	1	97,48 ± 7,64 ^a	112,84 ± 5,86 ^b
2	115,93 ± 10,00 ^b	91,88 ± 13,34 ^a	81,51 ± 2,20 ^a
3	89,80 ± 3,26 ^c	83,01 ± 2,80 ^b	75,54 ± 2,46 ^a

Valores medios ± desviación estándar, n = 3

Valores en la misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

Así mismo, los valores de AG también se vieron influenciados por el agregado de ceras, especialmente en las películas elaboradas con 2% m/m de pectina, donde se evidencia una disminución de la capacidad de absorción de agua de las películas con el agregado de ceras de girasol. En las películas que contienen 3% m/m de pectina, se evidencia una variación de los valores de AG, siendo significativamente diferente el encontrado con la proporción 0,2. El valor más bajo de AG fue el encontrado en películas con niveles más altos de pectina y ceras, indicando la contribución del carácter hidrófobo atribuido a las ceras de girasol.

Tabla 3. Absorción de agua (%).

Pectina (% m/m)	Proporción de ceras de girasol (g ceras/g pectina)		
	0,1	0,2	0,3
	1	35,27 ± 3,70 ^a	32,21 ± 3,72 ^a
2	32,91 ± 1,47 ^b	25,98 ± 4,69 ^a	25,36 ± 2,02 ^a
3	19,20 ± 0,94 ^a	25,64 ± 1,68 ^b	17,77 ± 3,29 ^a

Valores medios ± desviación estándar, n = 3

Valores en la misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05)

Los valores de velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) y permeabilidad al vapor de agua (PVA) se muestran en la **Tabla 4**. Respecto a VTVA, el análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre los valores encontrados para las películas con 1 y 2% m/m de pectina, apreciándose una mayor disminución de la velocidad de transmisión de vapor de agua con el incremento en la proporción de ceras comparada con la encontrada en películas con 3% m/m de pectina, confirmando las propiedades de barrera al vapor de agua que poseen las ceras de girasol.

El rango de valores encontrados para PVA estuvo entre $5,642 \times 10^{-3}$ y $1,843 \times 10^{-3}$ g mm/kPa día cm². En películas con 1 y 2% m/m de pectina, se observa que los valores medios de permeabilidad disminuyeron con la adición de ceras, aunque fue significativo estadísticamente sólo en las películas con 1% m/m de pectina. En aquellas elaboradas con 3% de pectina se aprecia estadísticamente un aumento en la permeabilidad con la adición de ceras, lo que podría atribuirse al significativo aumento del espesor en las proporciones 0,2 y 0,3 con respecto a la de 0,1 (véase **Tabla 1**).



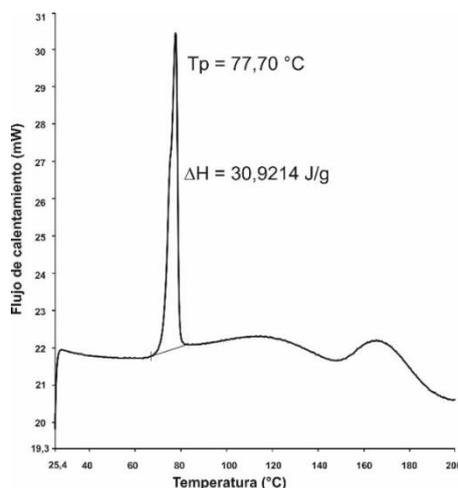
Tabla 4. Velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVAx10² g/día cm²) y permeabilidad al vapor de agua (PVAx10³ g mm/kPa día cm²).

Pectina (% m/m)	Proporción de ceras de girasol (g ceras/g pectina)		
	0,1	0,2	0,3
	VTVA		
1	11,077 ± 1,268 ^b	8,767 ± 0,114 ^{ab}	8,067 ± 0,004 ^a
2	6,923 ± 0,520 ^b	6,428 ± 0,039 ^{ab}	5,714 ± 0,161 ^a
3	5,689 ± 0,296 ^a	5,425 ± 0,048 ^a	5,304 ± 0,141 ^a
	PVA		
1	2,417 ± 0,055 ^b	2,224 ± 0,223 ^{ab}	1,843 ± 0,089 ^a
2	3,202 ± 0,057 ^a	2,669 ± 0,862 ^a	2,480 ± 0,287 ^a
3	2,926 ± 1,015 ^a	5,642 ± 0,229 ^b	5,636 ± 0,943 ^b

Valores medios ± desviación estándar, n = 2

Valores en la misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05)

En la **Figura 3** se muestra el comportamiento térmico representativo de las películas. En todas las muestras se observó un pico de fusión de las ceras a aproximadamente 74-80°C y un cambio entálpico asociado a dicha fusión entre 12,334 y 56,235 J/g.

**Figura 3.** Perfil térmico representativo de las películas de pectina y ceras de girasol.

CONCLUSIONES

A partir de emulsiones de pectina y ceras de girasol fue posible obtener películas flexibles y adecuadas para manipular. En general, la superficie lograda en todas las muestras fue uniforme, obteniéndose un cambio significativo de espesor de las películas con la inclusión de las ceras en películas con 3% de pectina. Las imágenes estructurales mostraron primero una migración de la fase lipídica hacia la parte superior de las películas debido a la diferencia de densidad entre los componentes hidrófobos y la matriz polimérica; y también una buena distribución de estos componentes a medida que la cantidad de ceras aumentó. Los resultados de permeabilidad y resistencia al agua de las películas se vieron influenciados significativamente por el agregado de ceras de girasol, indicando el carácter de barrera aportado por las mismas y siendo complemento de las propiedades brindadas por la pectina a la matriz polimérica. Los análisis realizados mostraron películas con características satisfactorias para ser aplicadas a alimentos, brindando protección y barrera al deterioro de los mismos.



BIBLIOGRAFÍA

- ASTM. 1995. Standard test methods for water vapor transmission of materials (E96-95). Annual book of ASTM standards Vol. 4.06, American Society for Testing and Materials. West Conshohochen, Philadelphia. 697–704.
- Baldwin E, Hagenmaier R, Bai J. 2011. Edible coatings and films to improve food quality: CRC Press
- Bäumler ER, Carelli AA, Martini S. 2013. Physical properties of aqueous solutions of pectin containing sunflower wax. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(6): 791-802.
- Bäumler ER, Carelli AA, Martini S. 2014. Preparation and physical properties of calcium pectinate films modified with sunflower wax. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(11): 1534-1545.
- Braccini I, Pérez S. 2001. Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4): 1089-1096.
- Debeaufort F, Voilley A. 1995. Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(2): 183-190.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo Y. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>, 8: 195-199.
- Díaz-Rojas E, Pacheco-Aguilar R, Lizardi J, Argüelles-Monal W, Valdez M, Rinaudo M, Goycoolea F. 2004. Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*, 18(2): 293-304.
- Espitia PJP, Du W-X, de Jesús Avena-Bustillos R, Soares NdFF, McHugh TH. 2014. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties-A review. *Food Hydrocolloids*, 35: 287-296.
- Han JH. 2005. Innovations in food packaging: Academic Press
- Leroux J, Langendorff V, Schick G, Vaishnav V, Mazoyer J. 2003. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4): 455-462.
- Nguyen Q, Germain Y, Clement R, Hirata Y. 2001. Pervaporation, a novel technique for the measurement of vapor transmission rate of highly permeable films. *Polymer Testing*, 20(8): 901-911.
- Pérez-Gago MB, Krochta JM. 2001. Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 996-1002.
- Schultz T, Miers J, Owens H, Maclay W. 1949. Permeability of pectinate films to water vapor. *The Journal of Physical Chemistry*, 53(9): 1320-1330.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del trabajo al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET (PIP 2013-20120100243), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, ANPCyT y a la Universidad Nacional del Sur, UNS (PGI 24/M132).



Aislamiento, identificación y actividad antagonista de bacterias ácido lácticas provenientes del medio marino patagónico para la biopreservación de alimentos

Delcarlo, S.B. ^(1,2); Parada, R.B. ⁽³⁾; Schelegueda, L.I. ^(1,2); Vallejo, M. ⁽³⁾; Marguet, E.R. ⁽³⁾; Campos, C.A. ^(1,2)

⁽¹⁾ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Intendente Güiraldes s/n, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina.

⁽²⁾ CONICET, Buenos Aires, Argentina.

⁽³⁾ Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Chubut, Argentina.

RESUMEN

El objetivo fue aislar, identificar y evaluar la actividad antagonista de bacterias ácido lácticas presentes en moluscos (vieira, mejillón y almeja) de la costa patagónica argentina. Las tres cepas seleccionadas fueron identificadas como *Enterococcus mundtii* por medio de pruebas bioquímicas y PCR. La actividad antagonista de las cepas se evaluó mediante el ensayo de difusión en agar frente a bacterias de colección a pH original y ajustado a 6,00. A pH original, todos los sobrenadantes libres de células (SLC) mostraron actividad contra *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus plantarum*. Además los SLC de las cepas aisladas de vieira y almeja fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*. A pH 6,00 también se determinó el título de los SLC. Todos ellos presentaron actividad contra *L. innocua*, *E. coli* y *Lb. plantarum*. Adicionalmente, el SLC proveniente de la cepa aislada de mejillón, mostró actividad inhibitoria contra *Ps. fluorescens*. La actividad de los SLC a pH 6,00 se mantuvo hasta la dilución 16^{-1} , llegando en algunos casos hasta 64^{-1} . El uso de las sustancias producidas por las cepas estudiadas podría ser promisorio para inhibir el desarrollo de microorganismos comúnmente presentes en pescado.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, sustancias tipo bacteriocinas, *Enterococcus mundtii*, pescado

ABSTRACT

The objective was to isolate, identify and assess the antagonist activity of lactic acid bacteria present in mollusks (scallop, mussel and clam) from the Patagonian coast in Argentina. Selected strains were identified as *Enterococcus mundtii* by biochemical assessment and PCR. The strain's antagonist activity was evaluated by the well diffusion agar assay against bacteria at the original pH, and at pH 6.00. At the original pH, all cell free supernatants (CFS) showed activity against *Listeria innocua*, *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum*. Furthermore, CFS from scallop and clam could inhibit the growth of *Pseudomonas fluorescens*. At pH 6.00 the titer of the CFS was also determined. All strains showed activity against *L. innocua*, *E. coli* and *Lb. plantarum*. Additionally, the CFS from the mussel had activity against *Ps. fluorescens*. The activity of the CFS at pH 6.00 ranged from dilutions of 16^{-1} to 64^{-1} . The use of the substances produced by the studied strains would be promising to inhibit the development of microorganisms commonly present in fish.

Key words: lactic acid bacteria, bacteriocin like substances, *Enterococcus mundtii*, fish

INTRODUCCIÓN

El pescado es un alimento altamente perecedero. Entre los procesos de deterioro que limitan su vida útil pueden mencionarse reacciones químicas y enzimáticas, sin embargo, la causa principal es el crecimiento de microorganismos (Gram 2010). Debido a su rápido deterioro y a que frecuentemente el pescado se consume lejos del lugar de captura, la congelación resulta ser el método más utilizado para extender su vida útil (Gómez-Sala et al. 2016). Aunque la congelación es más efectiva que la refrigeración, no logra conservar todas las características del producto fresco. Esto genera una nueva problemática con los consumidores, quienes demandan alimentos de alta calidad, con características similares al producto natural, seguros, mínimamente procesados y cuyas propiedades se conserven por el mayor tiempo posible (Gholfi et al. 2006, Balciunas et al. 2013). Como consecuencia, la búsqueda de nuevas tecnologías para la preservación de pescado resulta de interés.



En este contexto, en los últimos años, la biopreservación ha captado gran atención. Esta se basa en la extensión de la vida útil y el aumento de la seguridad de un alimento a través del uso de bacterias, o de la acción antimicrobiana de alguno de sus productos (Tomé et al. 2008). Entre los microorganismos utilizados para la biopreservación de alimentos se destacan las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas son bacterias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y que son consideradas aptas para el consumo (Rivas et al. 2012). Las BAL han sido utilizadas en la tecnología de alimentos a lo largo del tiempo (Deegan et al. 2006). Actualmente se utilizan para la producción de numerosos alimentos como coadyudantes, pero sus propiedades para la preservación de alimentos no han sido totalmente explotadas (Mokoena et al. 2016). La acción antagonista de las BAL se basa en su capacidad para competir con la flora nativa por nutrientes específicos y en su capacidad para producir diversas sustancias como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos (Deegan et al. 2006, Tomé et al. 2008). Inicialmente se creyó que estos péptidos tenían actividad muy selectiva y que inhibían únicamente el crecimiento de bacterias taxonómicamente cercanas. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que pueden tener una actividad más amplia, lo cual transforma a las BAL en una herramienta viable para la preservación de alimentos (Schelegueda et al. 2015). En el marco de esta problemática, el objetivo del presente trabajo fue aislar, identificar y evaluar la actividad antagonista de BAL presentes en moluscos de la costa patagónica argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y selección de las cepas

Para llevar a cabo el estudio, se recolectaron especímenes de moluscos en la costa noreste de la provincia de Chubut, Patagonia Argentina en los meses de abril y mayo del año 2016. Los moluscos utilizados fueron ejemplares de vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*), almeja rayada (*Ameghinomya antiqua*) y mejillones (*Mytilus edulis platensis*). Para aislar las bacterias presentes en dichos organismos, se tomó asépticamente una alícuota de 1 g de vísceras de moluscos y se colocó en medios selectivos para BAL con la finalidad de realizar un enriquecimiento. Los caldos utilizados fueron caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) sin acetato de sodio y MRS a pH 5,4 (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). Para seleccionar las cepas, se estudió la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células (SLC) contra *Listeria innocua* aplicando el método de difusión en agar, el cual se detallará más adelante. El origen de las cepas seleccionadas y el medio utilizado para cada aislamiento puede observarse en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Especie, origen y medio de aislamiento de las cepas seleccionadas

Cepa	Especie del aislamiento	Origen	Medio de aislamiento
CH3	Vieira	Playa Bengoa, Golfo San José, Península Valdés, Departamento Biedma	MRS sin acetato
CH13	Almeja	Playa Bengoa, Golfo San José, Península Valdés, Departamento Biedma	MRS pH 5,4
CH42	Mejillón	Caleta Carolina (Camarones), Departamento Florentino Ameghino	MRS sin acetato

Cada muestra fue incubada durante 24 horas a 30°C. De los caldos en los cuales se observó turbidez, se realizó un aislamiento en placas de Petri con agar MRS. Las placas se incubaron durante 24 h a 30°C. Luego se seleccionaron las colonias en función de la coloración de Gram, la morfología celular y las pruebas de la catalasa y oxidasa. Las cepas se conservaron a -30°C en caldo MRS y glicerol 10% (v/v) para su posterior uso.

Identificación fenotípica de las cepas seleccionadas

Las tres cepas seleccionadas, fueron identificadas preliminarmente a nivel de género mediante el crecimiento a 45°C, a pH 9,6; hidrólisis de la esculina en presencia de sales biliares (40%), actividad de pirrolidonil aminopeptidasa (PYR) y leucina-aminopeptidasa (LAP).



Las colonias seleccionadas pertenecientes al género *Enterococcus* se identificaron a nivel de especie mediante fermentación de azúcares y producción de pigmento según el esquema propuesto por Manero y Blanch (1999).

Identificación genotípica de las cepas seleccionadas

Luego de la identificación fenotípica preliminar, las cepas seleccionadas se confirmaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para tal fin, las cepas de enterococos se incubaron a 37°C durante 12 horas en caldo MRS, se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics, Promega (Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Los cebadores y protocolos utilizados para la amplificación de los genes específicos de especies fueron los descritos por Jackson et al. (2004), mientras que para la identificación de género se utilizaron los cebadores rrs (16S ARNr) descrito por Kariyama et al. (2000) como un control interno de PCR.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La electroforesis de los productos de la amplificación genética se realizó en gel de agarosa al 1,2 %, a 70 V durante 1 h en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA, pH 8). Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 minutos en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio de 0,5 µg/mL; posteriormente se lo visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó.

Determinación de factores de virulencia

Actividad de la gelatinasa

La prueba se realizó en agar tripticosa soja (Britania, Argentina) suplementado con 0,8% (m/v) de gelatina. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C y se revelaron con una solución de tricloroacético al 20% (v/v). Las zonas claras alrededor de las cepas se consideraron como positivas (Kanemitsu et al. 2001).

Actividad hemolítica

La producción de hemolisinas se evaluó en agar cerebro-corazón (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) suplementado con sangre desfibrinada de conejo al 5%, luego de una incubación a 37°C durante 48 horas. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completa alrededor de las colonias (□-hemólisis)

Resistencia a vancomicina

Para la búsqueda de microorganismos con potencial resistencia se sembraron 5 □l de suspensiones bacterianas de 1x10⁶ células/ml en placas de agar bilis-esculina (Merck, Alemania) suplementado con vancomicina (6 □g/ml) según las recomendaciones de Domig et al. (2003). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C y se consideró crecimiento cuando se observó desarrollo de color negro en el medio citado.

Estudio de la actividad antagonista

Obtención de los sobrenadantes libres de células

El primer paso para la determinación de la actividad antagonista de las cepas seleccionadas fue la obtención de los SLC que se realizó según el método descrito por Schelegueda et al. (2015). Para ello, las bacterias se inocularon en caldo MRS, se incubaron durante 24 horas a 30°C y se centrifugaron a 6000 rpm a 4°C por 10 minutos. Los pellets resultantes se resuspendieron en 2 ml de caldo de tripteína soja -TSB- (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) con 10% de glicerol y se almacenaron a -18°C para su conservación.

Los SLC se calentaron a 100°C durante 5 minutos, con el objetivo de inactivar proteasas. Cada SLC se separó en dos alícuotas, a una de ellas se le midió el pH y a la otra se le ajustó el pH a un valor de 6,00 utilizando NaOH 1M. Finalmente, los SLC se esterilizaron por filtración (filtros de 0,20 µm de poro, Sartorius, Stedim Biotech, Alemania) y se almacenaron a 4°C.

Cepas indicadoras

Como cepas indicadoras se utilizaron las siguientes bacterias de colección para representar la flora deteriorativa usualmente aislada de productos de la pesca: *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838, *Shewanella putrefaciens* ATCC 8071 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Además, se trabajó con *Listeria innocua* ATCC 33090 como alternativa al patógeno *Listeria monocytogenes*. Se ha observado que dichos microorganismos responden de manera similar cuando son expuestos a distintos factores de estrés (Friedy et al. 2008). *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se incluyeron como indicadoras de las condiciones higiénicas de proceso. Antes de su uso, todas las bacterias fueron inoculadas en caldo TSB e incubadas por 24 horas a 30°C, dos veces.

Ensayo de difusión en agar

La actividad antagonista se evaluó por medio del método de difusión en agar (Schelegueda et al. 2015). Para ello, se inoculó un agar TSA al 1,2% con 10⁶ UFC/ml de los cultivos indicadores y se prepararon placas de Petri, dispensando 20 ml del agar inoculado en cada una. Cuando el agar estuvo solidificado, se formaron



pocillos de 6 mm de diámetro, utilizando un sacabocados. Se colocaron 50 µl de SLC (con o sin pH ajustado) en cada pocillo. Las placas se incubaron a 4°C por 2 horas para facilitar la difusión en el agar y luego a 30°C por 24 horas. Luego de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición. Como control se utilizó caldo MRS. Además, se determinó el título de los SLC a pH 6, mediante el ensayo de difusión en agar, realizando diluciones seriadas en caldo MRS (2^{-1} , 4^{-1} , 8^{-1} , 16^{-1} , 32^{-1} , 64^{-1} , 128^{-1} y 256^{-1}).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación

De todos los moluscos recolectados, se aislaron 80 cepas. Entre ellas, se seleccionaron 3, tomando como referencia su actividad antagonista contra *L. innocua*.

Los análisis para la identificación fenotípica fueron positivos en todas las pruebas, lo cual es indicativo del género *Enterococcus*. En la **Tabla 2** se resumen los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas. Se comprobó que todas las cepas presentan actividad enzimática de PYR y LAP, producen pigmento amarillo y son capaces de fermentar arabinosa, manitol y ribosa. Ello permite identificar en forma preliminar a las tres cepas como *Enterococcus mundtii*.

Tabla 2. Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas

Prueba bioquímica		Cepa		
		CH3	CH13	CH42
Actividad Enzimática	PYR	+	+	+
	LAP	+	+	+
Fermentación De Azúcares	Arabinosa	+	+	+
	Glucopiranosido	-	-	-
	Manitol	+	+	+
	Rafinosa	-	-	-
	Ribosa	+	+	+
	Sacarosa	-	-	-
	Sorbosa	-	-	-
Producción de pigmento		+	+	+

Utilizando el par de cebadores descrito para la identificación de género se obtuvo una ampliación de 320 pares de bases para las 3 cepas seleccionadas, mientras que para la identificación a nivel de especie se obtuvo una ampliación de 98 pares de bases correspondiente a *E. mundtii*.

Evaluación de la presencia de factores de virulencia

Ninguna de las cepas presentó resistencia a vancomicina, licuefacción de gelatinasa, ni actividad hemolítica. Los resultados obtenidos indican que las cepas podrían ser utilizadas en productos destinados a la alimentación humana.

Actividad antimicrobiana

En cuanto a la actividad antimicrobiana, se encontró que el efecto inhibitorio fue variable dependiendo del origen de la cepa y del pH estudiado. A pH original todos los SLC mostraron actividad contra *L. innocua*, *Lb. plantarum* y *E. coli*. Además, los SLC provenientes de las cepas CH3 y CH13 mostraron actividad contra *Ps. fluorescens*. Por otro lado, al aumentar el pH hasta un valor de 6,00, la actividad antagonista contra *L. innocua*, *Lb. plantarum* y *E. coli* se conservó, lo que sugiere que la acción inhibitoria no se debe a la acidificación. Sin embargo, al pH original (4,72-5,00), la actividad antagonista fue mayor en la mayoría de los casos. Ello pone de manifiesto que existiría un efecto sinérgico entre los dos factores de conservación: la sustancia antagónica producida por las diferentes cepas de *E. mundtii* y la acidificación del medio. Según Omar et al. (2013), las bacterias productoras de enterocinas, como las pertenecientes al género *Enterococcus*, pueden presentar actividad contra bacterias Gram negativas y su actividad inhibitoria se ve aumentada si dichas enterocinas se combinan con otros factores que aumenten la permeabilidad de la membrana externa, como por ejemplo el descenso del pH.



Tabla 3. Diámetro de los halos de inhibición (mm)

Microorganismo indicador	Cepa					
	CH3		CH13		CH42	
	pH 5,00	pH 6,00	4,96	6,00	4,72	6,00
<i>L. innocua</i>	20	18	19	17	22	18
<i>Lb. plantarum</i>	25	16	23	17	20	18
<i>E. coli</i>	10	18	20	18	18	17
<i>Ps. fluorescens</i>	10	-	12	-	-	12
<i>St. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-	-	-	-

En cuanto al título realizado a pH 6,00, los tres SLC inhibieron el crecimiento de *L. innocua*, *Lb. plantarum* y *E. coli* a pesar de encontrarse diluidos (**Tabla 4**). Además, el SLC proveniente de la cepa CH42 inhibió el desarrollo de *Ps. fluorescens*, hasta una dilución de 16^{-1} . En investigaciones previas, se destaca que las BAL, suelen poseer actividad contra microorganismos genéticamente cercanos (O'Connor et al. 2015, Yi et al. 2016), y que no es común su actividad contra microorganismos Gram negativos (Santos et al. 2016, Casaburi et al. 2016). Sin embargo, Schelegueda (2014), reportó resultados similares a los obtenidos en este trabajo, ya que observó que *E. mundtii* ETW56 presenta actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivas, y contra algunas Gram negativas, como *Ps. aeruginosa* y *Ps. fluorescens* a pH 5,00 y 5,50. Adicionalmente, según Ferreira (2007), se han aislado cepas de *E. mundtii* con actividad antagonista contra *Salmonella enteritidis*.

Tabla 4. Máxima dilución a la cual se obtuvo actividad inhibitoria

Microorganismo indicador	Cepa		
	CH3	CH13	CH42
<i>L. innocua</i>	128^{-1}	32^{-1}	16^{-1}
<i>Lb. plantarum</i>	32^{-1}	64^{-1}	16^{-1}
<i>E. coli</i>	64^{-1}	64^{-1}	16^{-1}
<i>Ps. fluorescens</i>	-	-	16^{-1}
<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-
<i>St. aureus</i>	-	-	-

CONCLUSIONES

Las tres BAL seleccionadas fueron identificadas como *Enterococcus mundtii*, y en todos los casos se observó buena actividad antagonista contra las bacterias indicadoras de interés. Aunque los tres SLC inhibieron el crecimiento de *L. innocua*, *Lb. plantarum* y *E. coli*, su actividad antagonista fue variable cuando se los estudió contra *Ps. fluorescens*. La cepa CH42 fue la única capaz de inhibirla, pero sus títulos con las restantes bacterias indicadoras a pH 6 fue el menor de todos. Esto indicaría que una mezcla de los SLC sería una buena opción para potenciar su capacidad antagonista. Fue posible descartar el efecto de la acidificación en la inhibición de las bacterias indicadoras, razón por la cual se puede inferir que las BAL estudiadas son capaces de producir sustancias con actividad antagonista. En estudios posteriores se realizarán los ensayos correspondientes para confirmar la producción de las mismas. Por último, pudo comprobarse la ausencia de factores de virulencia. En base a lo comentado, es posible concluir que las tres cepas aisladas tienen potencial aplicación en la biopreservación de alimentos.



BIBLIOGRAFÍA

- Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Gombossy de Melo Franco BD, Converti A, Pinheiro de Souza Oliveira R. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32: 134-142.
- Casaburi A, Di Martino V, Ferranti P, Picariello L, Villani F. 2016. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*, 59: 31-45.
- Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058–1071.
- Domig FJ, Mayer HK, Kneifel W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 147-164.
- Ferreira AE, Canal N, Morales D, Bopp Fuentefria D, Corção G. 2007. Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans' feces. [Brazilian Archives of Biology and Technology](#), 50: 249-285.
- Friedly EC, Crandall PG, Ricke S, O'Bryan CA, Martin EM, Boyd LM. 2008. Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *Journal of Food Science*, 73(4):174-178.
- Ghali H, Allaoui A, Destain J, Benkerroum N, Thonart P. 2006. Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *Journal of Food Protection*, 69: 1066-1071.
- Gómez-Sala B, Herranza C, Díaz-Freitas B, Hernández PE, Sala A, Cintas LM. 2016. Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. *International Journal of Microbiology*, 223: 41-49.
- Gram, L. 2010. Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products. En: Sperber WH, Doyle MP (Eds.). *Compendium of the Microbiological Spoilage of Food and Beverages*. New York, EE.UU.: Springer. Pag: 87-120.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barret JB. 2004. Use of a genus- and species- specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8): 3558-3565.
- Kariyama R, Mitsuhashi R, Chow JW, Clewell DB, Kumoni H. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8): 3092–3095.
- Kanemitsu K, Nischino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H. 2001. Quantitative determination of gelatinase activity among *Enterococci*. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 11-16.
- Manero A, Blanch AR. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4425-4430.
- Mokoena MP, Mutanda T, Olaniran AO. 2016. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food and Nutrition Research*, 10.3402/fnr.v60.29630
- Omar NB, Abriouel H, Fliss I, Fernandez-Fuentes MA, Galvez A, Drider D. 2013. Bacteriocins: Natural weapons for control of food pathogens. En: *Management of Microbial Resources in the Environment*. Malik A, Alves M, Grohmann, (Eds.). London, Elsevier. Pag 471-494.
- O'Connor PM, Ross P, Hill C, Paul DC. 2015. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science* 2: 51–57.
- Rivas FP, Castro MP, Vallejo M, Marguet E., Campos CA. 2012. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *Food Science and Technology*, 46: 428-436.
- Santos VL, Nardi Drummond RM, Dias-Souza MV. 2016. Bacteriocins as antimicrobial and antibiofilm agents. En: Larroche, Sanroman, Du, Pandey. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. 1° edición, pag 403-435.
- Schelegueda LI, Vallejo M, Gliemmo MF, Marguet ER, Campos CA. 2015. Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. *LWT – Food Science and Technology*, 64: 794-801
- Schelegueda LI. 2014. Tesis Doctoral: Optimización del uso de preservadores en combinación con otros factores de conservación como estrategia para mejorar la calidad de pescado. Universidad de Buenos Aires. Pag: 198



Tomé E, Gibbs PA, Teixeira PC. 2008. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 285-294.

Yi L, Dang J, Zhang L, Wu Y, Liu B, Lü X. 2016. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control*, 67: 53-62.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.



Efecto de un recubrimiento comestible de alginato sobre la estabilidad de un caramelo tipo toffee

De'Nobili M.D.^{1,3}, Bernhardt D.C.^{1,3}, Pérez C.D.^{2,3}, Rojas A.M.L.^{1,3}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias; Argentina.

² Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), INTA-Castelar, provincia de Buenos Aires.

³ CONICET – Argentina.

dana@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se estudió la estabilidad de un caramelo comercial tipo toffee con recubrimiento de alginato portador de ácido L-(+)-ascórbico (AA) (COAT) como envase primario, frente a la estabilidad del mismo con su envoltorio primario original (CONTROL). Los caramelos fueron almacenados a 57,7% de humedad relativa, 25 °C, en aire, durante 12 meses. En ambos caramelos, la actividad de agua (a_w) se mantuvo constante y la temperatura de transición vítrea (T_g) fue menor a 25°C (sistemas amorfo goma) en todo el almacenamiento. La T_g en los caramelos COAT fue menor que en los caramelos CONTROL, esto podría relacionarse al contenido de humedad el cual aumentó en los caramelos COAT durante los primeros 6 meses. Los espectros de emisión-excitación demostraron la aparición de productos de oxidación a los 3 meses de almacenamiento en ambos caramelos, siendo a cada tiempo estudiado, mayor la intensidad de los picos en los caramelos CONTROL; a su vez, los ensayos del ácido tiobarbitúrico (TBA) mostraron valores significativamente menores de malondialdehído (MDA) en COAT. El reemplazo de un envase biodegradable por un recubrimiento comestible en un caramelo tipo toffee podría ser factible y ventajoso al retrasar la oxidación del mismo mediante la incorporación del AA.

Palabras Clave: recubrimiento de alginato, caramelo, ácido ascórbico, oxidación.

ABSTRACT

The stability of a commercial toffee with a primary packaging made of an alginate coating (COAT) loaded with L-(+)-ascorbic acid (AA) was evaluated against the toffee with its original primary packaging (CONTROL). Toffees were stored at relative humidity (57.7%), 25°C and in the presence of oxygen for a period of 12 months. In both systems, the water activity (a_w) remained constant and the glass transition temperature (T_g) was lower than 25 °C (amorphous rubbery systems) throughout the entire storage. T_g value determined in COAT was lower than that observed in CONTROL. This fact could be related to moisture content which increased in COAT in the first 6 months. Emission-excitation spectra showed the appearance of oxidation products at 3 months of storage in both systems. At each time studied, CONTROL toffee showed higher intensity of the peaks than COAT, while these systems showed significantly lower malondialdehyde (MDA) values in TBA assays. The replacement of a biodegradable container by an edible coating in a toffee may be feasible and advantageous to delay the oxidation by loading AA.

Keywords: alginate coating, toffee, ascorbic acid, oxidation

INTRODUCCIÓN

El caramelo es uno de los productos de confitería más utilizado después del chocolate (Bouzas 1999). Existe una gran variedad de caramelos, entre los que se encuentran los caramelos duros y los caramelos suaves (toffees). El caramelo toffee contiene 1-6% de humedad, consiste en una mezcla de distintos ingredientes (jarabe de glucosa, leche, grasas vegetales) y se fabrica por calentamiento de la mezcla a una temperatura comprendida entre 118 y 130°C (Minifie 1989). Este tipo de caramelo es masticable y no necesita refrigeración durante el almacenamiento (Edwards 2001).

Los caramelos están elaborados a partir de azúcar, la cual puede presentarse en diferentes estados: amorfo, vítreo o cristalino. Los caramelos tipo toffee se encuentran en el estado amorfo. Si alguna de las condiciones del proceso varían como la temperatura o el contenido de humedad en el producto esto provocaría un cambio del estado amorfo al estado vítreo (Lim 2007); es decir, habría una transición de fases provocando cambios



fisicoquímicos importantes por lo cual es crítico en estos caramelos la acción protectora del envoltorio. Los recubrimientos comestibles elaborados con biopolímeros están destinados a funcionar como barreras pudiendo prolongar la vida útil de los alimentos. Éstos proveen de protección contra la contaminación microbiana externa, actúan como barrera al vapor de agua y gases, y también pueden ser utilizados para vehicular aditivos, tales como antimicrobianos, agentes antioxidantes, colorantes, etc. (Han 2000, Cuppett 1994, Flores 2007, Campos et al. 2011). Muchos biopolímeros han llamado la atención debido a su propiedad de formar películas y recubrimientos comestibles (Lai y Padua 1997). El alginato es un biopolímero que viene siendo muy aplicado al desarrollo de materiales biomédicos y, en el campo de los alimentos, al desarrollo de recubrimientos y películas comestibles (Lee y Mooney 2012). Es un copolímero constituido por ácidos gulurónico (G) y manurónico (M), lo que da lugar a alginatos con distintos desempeños en función de la proporción y distribución de bloques GG, MM y MG-GM en las macromoléculas de alginato. Sólo los bloques GG, y con al menos 10-14 unidades de G, son los que pueden ser entrecruzados por el Ca^{2+} , presentando así la capacidad de gelificar (Braccini y Pérez 2001), lo cual hace que el alginato encuentre una importante aplicación en encapsulamiento (Stabler et al. 2001).

Conocida como vitamina C, el ácido L-(+)-ascórbico (AA) es uno de los micronutrientes que participa en el balance antioxidante-prooxidante en los seres humanos (Morrisey y O'Brien 1998, Weisburger 1999). Es un antioxidante soluble en agua, útil en la conservación de alimentos. La estabilidad del AA se ve afectada por las condiciones de procesamiento y almacenamiento, en función de un gran número de factores tales como la temperatura, humedad relativa, la presión parcial de oxígeno, la luz, y la permeabilidad y configuración del envase (Kitts 1997). Estudios anteriores demostraron que la compartimentalización del AA en la matriz polimérica constituyente de una película comestible ayuda a lograr la estabilización del AA, ya que puede impedir las interacciones del mismo con el oxígeno y/o con otros preservadores, nutrientes o componentes de los alimentos. Además las películas pueden proporcionar una actividad antioxidante localizada en las interfaces y de liberación controlada (León y Rojas 2007, Pérez et al. 2009, 2013, De'Nobili et al. 2013 a, b).

El objetivo del presente trabajo consistió en reemplazar el envoltorio primario de un caramelo comercial tipo toffee por un recubrimiento comestible de alginato portador de AA ya que constituye una estrategia interesante para la preservación de alimentos y, también del medio ambiente. A su vez, la incorporación del AA en el recubrimiento comestible podría retrasar la oxidación del caramelo. Se realizaron diferentes ensayos fisicoquímicos para estudiar la estabilidad físico-química del caramelo y la oxidación del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del recubrimiento de alginato

La elaboración del recubrimiento de alginato se realizó disolviendo alginato (1,5% p/p) (Manugel, FMC BioPolymer) a temperatura ambiente en agua destilada, seguido del agregado de glicerol (0,5% p/p) como plastificante, sorbato de potasio (0,03% p/p) (antimicrobiano) y AA (0,1% p/p) luego de haber calentado la solución del polímero en agua hasta 90°C. Una vez homogeneizada la solución, se recubrieron los caramelos tipo toffee sin su envoltorio primario original por inmersión durante diez segundos en la solución de alginato. Seguidamente fueron sumergidos durante diez segundos en una solución cloruro de calcio (2% p/p). A continuación fueron escurridos y secados en un horno de convección forzada constante a 40°C durante 30 minutos. Luego, se dejaron enfriar en un desecador conteniendo CaCl_2 anhidro durante sesenta minutos a 25°C. Por último, los caramelos COAT se envolvieron con el envase secundario de PVC metalizado del caramelo comercial donde se encuentra impresa toda la información nutricional del mismo.

El sistema de caramelos CONTROL consistió en los caramelos con su envoltorio primario y secundario original.

Todos los caramelos (COAT y CONTROL) fueron almacenados en un desecador de policarbonato (Nalgene®, EEUU) de 27 cm de diámetro a 25°C, 57,7% de humedad relativa (HR), en presencia de oxígeno durante 12 meses. La HR fue condicionada por la saturación de la atmósfera del “desecador” contenedor, según la presión de vapor de equilibrio generada por la solución saturada contenida en el mismo (solución saturada de NaBr, $a_w = 0,577$) (Greenspan 1977).

Se tomaron muestras a los 0, 3, 6 y 12 meses para realizar los ensayos que se detallan a continuación.

Actividad de agua (a_w)

A lo largo del almacenamiento se midió la a_w con un equipo Decagon AquaLab (Series 3 Water activity meter, Estados Unidos), usando soluciones saturadas de sales con actividad de agua conocida, a 25°C: MgCl_2



($a_w^\circ = 0,333$), NaBr ($a_w^\circ = 0,577$) y NaCl ($a_w^\circ = 0,752$) (Greenspan 1977). Las mediciones se realizaron por triplicado, informando para el análisis el valor promedio y el desvío estándar correspondiente.

Luminosidad (L)

Fue medido como indicador de luminosidad en la escala Hunter Lab, utilizando un colorímetro Minolta (CM-508d, Japón) con un ángulo de apertura de 1.5 cm de diámetro (León et al. 2008). Los valores estándar considerados fueron aquellos correspondientes al fondo blanco.

Humedad

Los caramelos fueron pesados en balanza analítica (0,0001 g) y colocados en pesafiltros de vidrio. Luego, fueron deshidratados al vacío en estufa a 70°C hasta alcanzar peso constante, lo cual involucró un período de alrededor de 12 horas. Las determinaciones fueron realizadas en seis muestras de caramelos de cada condición evaluada (Flores et al. 2007), informándose el promedio y el desvío estándar correspondiente.

Temperatura de transición vítrea (Tg)

Se utilizó un DSC modulado (TA Instruments, Estados Unidos) para determinar la Tg (temperatura en el punto medio de la transición) a partir del segundo barrido de temperatura (5°C/min) realizado entre -60 y 70 °C. Se utilizaron ≈ 10 mg de muestra colocados en una cápsula de aluminio (40 μ L) sellada herméticamente. La muestra utilizada para los caramelos COAT se tomó del centro del caramelo (COAT centro) y de la superficie del caramelo (COAT superficie), mientras que para los caramelos CONTROL se tomó una muestra del centro del mismo. DE esta manera, se realizaron comparaciones de 3 sistemas. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. El ensayo fue realizado por duplicado.

Ensayos de compresión

Se utilizó una máquina universal de testeo Instron modelo 3345 (Estados Unidos) dotada de una celda de carga de 5000 N, una punta de compresión tipo punzón de 4,8 mm de diámetro y de un equipo informático de adquisición y tratamiento de datos. Se realizó un ensayo de compresión uniaxial del material a una velocidad de 0,42 mm/seg hasta un 85% de deformación. Se obtuvieron curvas de fuerza vs. distancia, las cuales se convirtieron a curvas de esfuerzo o stress normal (σ) vs. deformación relativa o strain normal (γ). Se calculó el Módulo de Young (E) a partir del valor de la pendiente en la porción inicial del test (región lineal) que cumple con la Ley de Hooke donde el esfuerzo es proporcional a la deformación relativa. El ensayo se realizó en nueve muestras a cada tiempo estudiado, obteniéndose como resultado el promedio con el desvío estándar correspondiente.

Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia fueron medidos mediante un espectrómetro (LS 55 fluorescence Spectrometer 230V, PerkinElmer, Estados Unidos) montado con el accesorio *front-surface* de ángulo variable y cubeta de cuarzo de 10 mm. El ángulo incidente sobre la muestra fue de 60° para minimizar la contribución de la luz reflejada y de la radiación dispersada así como el fenómeno de despolarización. Para la excitación se utilizó una lámpara de xenón. Se empleó una apertura o *slit* de excitación y emisión de 2 nm, y un intervalo de adquisición y tiempo de integración de 1 nm y 0,1 segundos, respectivamente. Las determinaciones fueron todas realizadas a temperatura ambiente. Los espectros de emisión se registraron en el intervalo de longitud de onda de 460 a 700 nm, aplicando la excitación a 450 nm para cada una de las muestras de caramelos, por duplicado.

Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA)

Se pesaron en balanza analítica 5,00 gr de caramelo en una bolsa plástica alta densidad para Stomacher. Se lo diluyó con una solución de tricloroacético 20%, homogeneizando en Stomacher. Luego, se completó a volumen final con agua destilada (25,00 ml). Se centrifugó y filtró. Con una pipeta, se tomaron 5,00 mL del sobrenadante y se colocó esta alícuota en un tubo de ensayo seco. Se agregaron 5,00 mL del reactivo TBA. Luego, el tubo fue tapado y agitado enérgicamente. Se lo colocó a continuación en un baño termostático a 95,0°C durante 2 hs. Luego fue enfriado bajo corriente de agua durante 10 min hasta que alcanzó temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de la solución obtenida en celdas de 10 mm a 530 nm, usando agua destilada como referencia.

Se realizó el siguiente cálculo para obtener el índice de TBA:

$$\text{Índice de TBA} = 50 \cdot (A-B)/M \quad (1)$$

donde:

A: Absorbancia de la muestra.

B: Absorbancia del blanco.

50: Factor aplicado si el matraz utilizado es de 25 mL y el ancho de las cubetas de 10 mm.

M: masa de la muestra, expresada en gramos.



Análisis estadístico de resultados

Para establecer diferencias significativas entre muestras, se realizó un ANOVA (α : 0,05) seguido por comparaciones múltiples con el test de Tukey. Para este análisis se utilizó el programa Statistica (versión 6, StatSoft, Inc. 2001, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron caramelos con recubrimiento de alginato con aspecto homogéneo, con un valor de $L= 30,2\% \pm 2,5\%$ mientras que los caramelos CONTROL presentaron un valor de $L=40,9\% \pm 1,5\%$. El valor menor de L en los caramelos COAT significa una disminución en la luminosidad y una tendencia mayor hacia el negro, lo cual condice con el proceso de secado al que fueron sometidos los caramelos COAT en la aplicación de la cobertura de alginato, donde podrían haberse desencadenado reacciones de Maillard.

El agua está presente en casi todos los alimentos y es responsable de una gran variedad de reacciones que pueden traer como resultado la reducción de la vida útil de los productos. La manera para poder controlar dichas reacciones es mediante el control de la actividad de agua de los alimentos. La a_w en ambos caramelos se mantuvo en un valor de $0,560 \pm 0,030$ durante todo el almacenamiento por lo que al ser la misma menor a 0,6 no habría crecimiento microbiano.

Como se puede observar en la **Figura 1**, la humedad de los caramelos CONTROL se mantuvo constante durante los primeros 6 meses mientras que en el segundo semestre tendió a disminuir, aunque no significativamente. Los caramelos COAT presentaron una tendencia al aumento de humedad, no significativo, durante los primeros 6 meses (**Fig. 1**), mientras que a los 12 meses de almacenamiento el valor de humedad coincidió con el valor a tiempo 0.

Las diferencias en las humedades de los productos podrían interferir drásticamente en la textura del caramelo. Se realizaron ensayos de compresión en los caramelos para evaluar la textura. Se observó que los caramelos CONTROL a los 12 meses de almacenamiento presentaron un valor de $E=130 \pm 20$ Pa mientras que el valor a tiempo inicial fue de $E=92 \pm 8$ Pa, lo que condice con la disminución de humedad al final del almacenamiento, dando como resultado un caramelo más duro. En el caso de los caramelos COAT, el valor de E fue menor a los 12 meses de almacenamiento ($E=75 \pm 6$ Pa), lo que resulta un caramelo más blando.



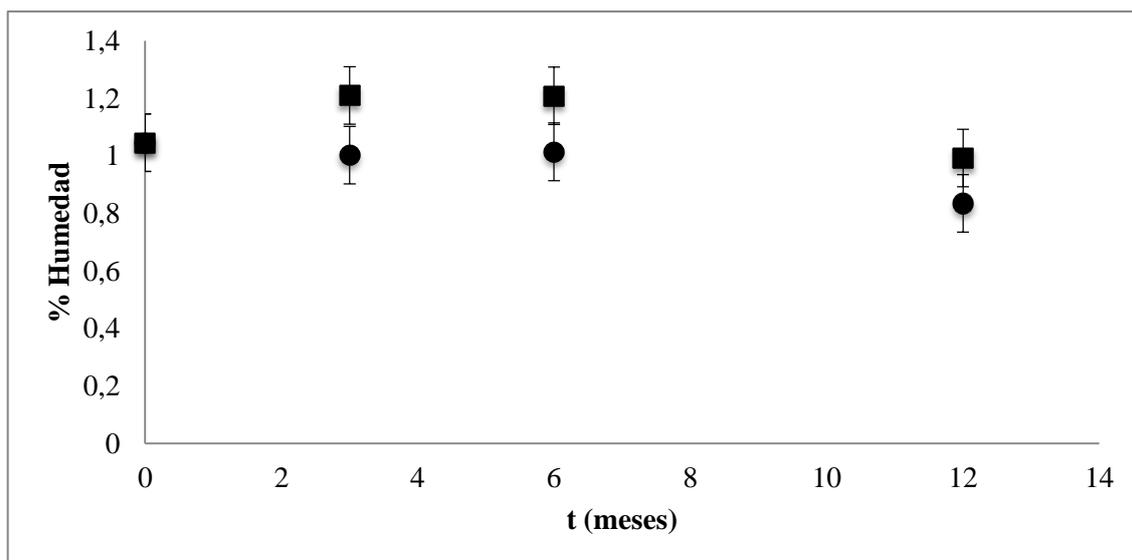


Figura 1: Porcentaje de Humedad (%) de los caramelos CONTROL (●) y COAT (■) a lo largo del almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar (n = 6).

La transferencia de humedad puede causar cambios en la Tg. Como se puede observar en la **Figura 2**, el valor de Tg a lo largo de todo el almacenamiento en ambos sistemas fue menor a 25°C, lo que justifica que los sistemas toffee están en estado amorfo goma, plastificados quizás por la humedad que pudieran haber ganado durante el almacenamiento, acorde a lo mostrado en la **Figura 1**. Se observó un aumento final de la Tg (**Fig. 2**), en consonancia con la tendencia a la disminución final del contenido de humedad observado a los 12 meses de almacenamiento (**Fig. 1**). Las estructuras en estado amorfo goma poseen una Tg baja, menor a la de almacenamiento, por lo que se encontrarían en un estado estable en lo que se refiere a lo requerido para un caramelo blando del tipo toffee. Si el producto se encontrara almacenado por debajo de la Tg, ciertas propiedades se verían afectadas, la más importante sería que la movilidad del agua se reduciría, su viscosidad aumentaría y por lo tanto el producto empezaría a desarrollar una textura vítrea no característica del mismo (Roos Yrjo 1994). La determinación de la Tg sirve para controlar y conocer la vida útil de los productos y evitar, en el caso de los caramelos duros, la pegajosidad, y en el caso de los caramelos suaves, el endurecimiento (Cedeño Briones 2009). La Tg en los caramelos COAT fue menor que en los caramelos CONTROL (**Fig. 2**), esto podría relacionarse al contenido de humedad; al aumentar el contenido de agua, aumenta la movilidad de las moléculas y la Tg disminuye. La cobertura de alginato posee glicerol como plastificante, esto podría justificar que la Tg medida en la superficie de los caramelos COAT sea menor que la Tg medida en el centro de los mismos (**Fig. 2**).

La incorporación del AA en el recubrimiento comestible podría retrasar la oxidación del caramelo. Varios autores han demostrado que la fluorescencia es un buen indicador de la oxidación temprana de los lípidos en sistemas alimenticios. Se han obtenido varios fluoróforos por reacción entre productos primarios y secundarios de peroxidación lipídica y aminas primarias, y la mayoría de los aldehídos insaturados formados serían precursores de compuestos fluorescentes. En este sentido, Yaacoub et al. (2009) analizaron los espectros de emisión del aceite obtenido de almendras y de semillas de sésamo que fueron sometidas a distintos tratamientos térmicos (tostado), encontrando que con el aumento del tiempo de calentamiento de las semillas se intensificaban los picos observados en el espectro con emisión-excitación ≈ 450 nm, indicando que podrían estar asociados a la neoformación de compuestos fluorescentes debido a los productos de oxidación. En la **Figura 3** se pueden observar los espectros de emisión de fluorescencia en el rango de 460-700 nm obtenidos por excitación a 450 nm de los caramelos CONTROL a lo largo del almacenamiento. Los mismos demostraron la aparición de productos de oxidación a los 3 meses de almacenamiento en ambos caramelos, siendo a cada tiempo estudiado, mayor la intensidad de los picos en los caramelos CONTROL (**Fig. 4**), donde el pico máximo con emisión a 540 nm correspondería, en función de lo previamente comentado, a productos de oxidación.



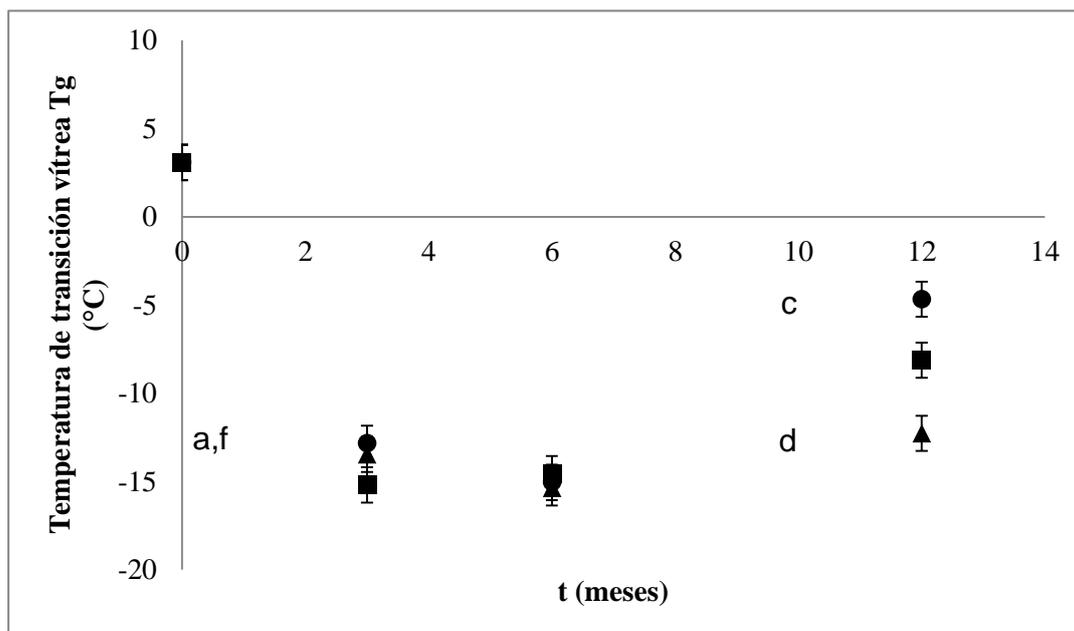


Figura 2: Temperatura de transición vítrea a lo largo del almacenamiento de los caramelos CONTROL (●), COAT centro (■) y COAT en la superficie (▲) del toffee. Las barras indican el desvío estándar (n = 6). Letras distintas implica diferencia significativa ($p < 0,05$).

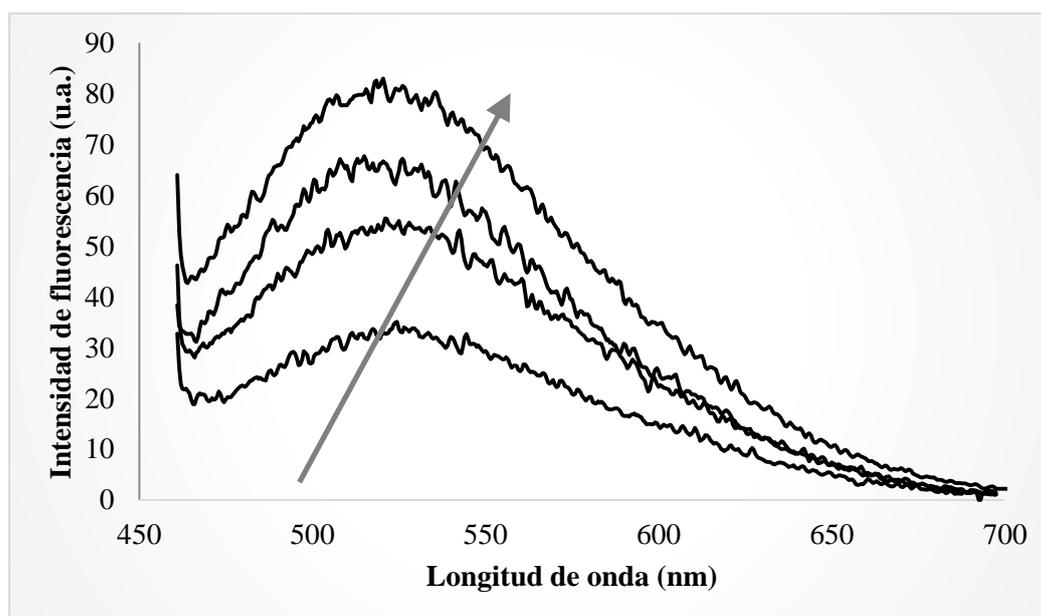
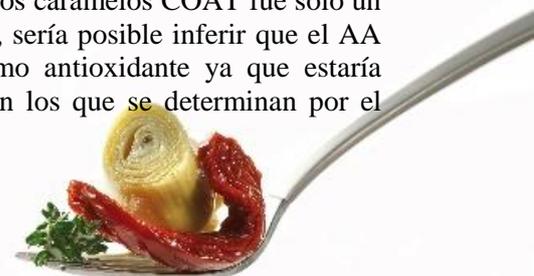


Figura 3: Espectro de emisión excitación 450 nm de los caramelos COAT. La flecha indica la dirección en la que aumenta el tiempo de almacenamiento.

Se realizó el ensayo de TBA para evaluar el proceso autooxidativo ocurrido en los caramelos durante el almacenamiento, con respecto al estado inicial de autooxidación del caramelo CONTROL. En la **Figura 5** se reportan los resultados obtenidos en los caramelos COAT y CONTROL a los 3 meses de almacenamiento y de los caramelos CONTROL a tiempo inicial. Como se puede observar, el nivel de los productos de autooxidación presentes en los caramelos CONTROL fue de un 50% mayor a los 3 meses de almacenamiento que al inicio del almacenamiento (0 días), mientras que en los caramelos COAT fue sólo un 8,6% mayor a los 3 meses de almacenamiento. A partir de estos resultados, sería posible inferir que el AA soportado en el recubrimiento de alginato estaría cumpliendo su rol como antioxidante ya que estaría evitando la formación de productos de autooxidación secundarios, que son los que se determinan por el



ensayo del TBA, siendo el nivel de los mismos no significativamente diferentes al del comienzo del ensayo (0 días) (**Fig. 5**).

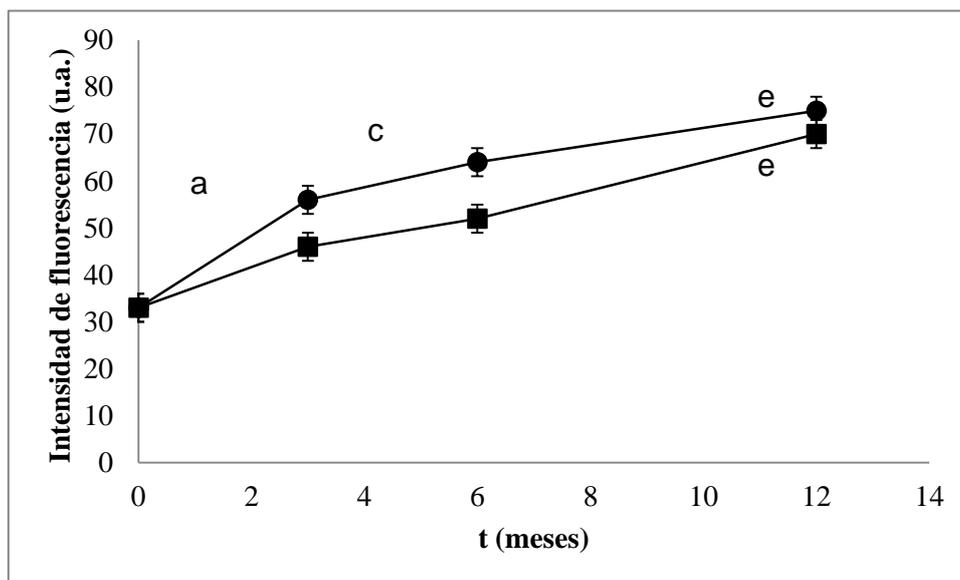


Figura 4: Intensidad de fluorescencia del pico máximo obtenido en el espectro emisión excitación atribuido a compuestos de oxidación (545 nm) en función del tiempo de almacenamiento de los caramelos CONTROL (●) y COAT (■). Las barras indican el desvío estándar (n = 6). Letras distintas implica diferencia significativa (p<0,05).

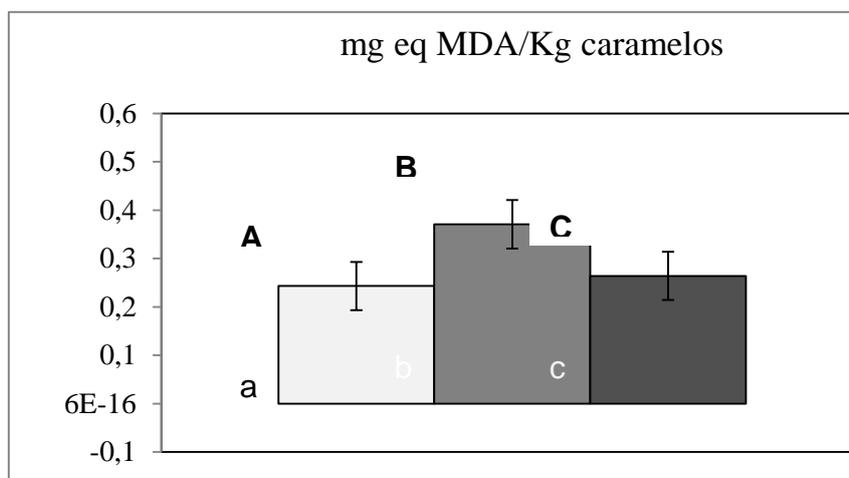


Figura 5: Los mg equivalentes de MDA determinados mediante el ensayo del TBA realizado sobre los caramelos: sistema CONTROL a tiempo inicial del ensayo (A); sistema CONTROL a tiempo 3 meses (B) y sistema COAT a tiempo 3 meses (C). Las barras de error corresponden al desvío estándar (n = 3). Letras minúsculas distintas implica diferencia significativa (p<0,05).

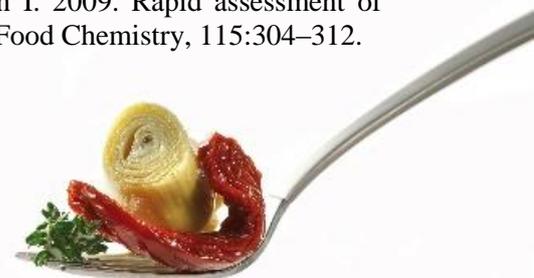
CONCLUSIONES

El reemplazo de un envase primario por un recubrimiento comestible en un caramelo tipo toffee podría ser factible, asegurando la estabilidad fisicoquímica del caramelo durante su almacenamiento y logrando de esta manera un producto *ecofriendly*. A su vez, resultaría sumamente ventajoso de aplicar ya que retrasaría la oxidación del mismo mediante la incorporación del AA soportado en el recubrimiento de alginato.



BIBLIOGRAFÍA

- Bouzas J. 1999. Whey products and lactose in confectionery applications. US Dairy Export Council. Application Monograph pp. 2–8.
- Braccini I y Pérez S. 2001. Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg box model revisited. *Biomacromolecules*, 2:1089–1096.
- Campos CA, Gerschenson LN y Flores SK. 2011. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity Food and Bioprocess Technology. *International Journal ISSN 1935-5130 Volumen 4 Number 6*.
- Cedeño Briones MA. 2009. Determinación de la Temperatura de Transición Vítrea en caramelos duros. Tesis de grado, Ingeniería de alimentos, Guayaquil, Ecuador.
- Cuppett SL. 1994. Edible coatings as carriers of food additives, fungicides and natural antagonists. En Krochta, J.M.; Baldwin, E.; Nisperos-Carriedo, M.O. *Edible films and coatings to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA.
- De’Nobili MD, Curto LM, Delfino JM, Soria M, Fissore EN y Rojas AM. 2013. *International Journal of Pharmaceutics*, 450: 95-103.
- De’Nobili MD, Pérez CD, Navarro DA, Stortz CA y 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
- Edwards WP. 2001. *La Ciencia de las Golosinas*. España: Editorial Acirbia. Pag 93-113, 121-122
- Flores S, Famá L, Rojas AM., Goyanes S y Gerschenson LN. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40:257-265.
- Greenspan L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 81 A(1), 89-96.
- Han JH. 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54:56-65.
- Kitts DD. 1997. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, 8:198–203.
- Lai HM, Padua GW. 1997. Properties and microstructure of plasticized zein films. *Cereal Chemistry*, 74(6):771–775.
- Lee KY y Mooney DJ. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.*, 37:106–126.
- León PG, Lamanna ME, Gerschenson LN, Rojas AM. 2008. Influence of composition of edible films based on gellan polymers on L-(+)-ascorbic acid stability. *Food Research International*, 41(6): 667-675.
- León PG, Rojas AM. 2007. Gellan gum films as carriers of L-(+)-ascorbic acid. *Food Research International*, 40:565–575.
- Lim MH. 2007. *Changes in Physical States of Confectionery Products due to the Availability of Water*. Nueva Zelanda.
- Minifie BW. 1989. *Chocolate, cocoa, and confectionery: science and technology* (3rd ed). NY: AVI 904 pp.
- Morrise PA y O’ Brien NM. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *International Dairy Journal*, 8:463–472.
- Pérez C, De’Nobili MD, Rizzo SA, Gerschenson L, Descalzo AM y Rojas AM. 2013. High methoxyl pectin–methyl cellulose films with antioxidant activity at a functional food interface. *Journal of Food Engineering* 116: 162–169.
- Pérez CD, Flores SK, Marangoni AG, Gerschenson LN y Rojas AM. 2009. Development of a high methoxyl-pectin edible film for retention of L-(+)- ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6844–685.
- Roos Y. 1994. *Characterization of Food Polymers Using State Diagrams*, Departamento de Tecnología de Alimentos, Helsinki Finlandia. Pag. 347-356.
- Stabler C, Wilks K, Sambanis A y Constantinidis I. 2001. The effects of alginate composition on encapsulated _TC3 cells. *Biomaterials*, 22:1301–1310.
- Weisburger JH. 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food and Chemical Toxicology*, 37:943-948.
- Yaacoub R, Saliba R, Nsouli B, Khalaf G, Rizkallah J y Birlouez-Aragon I. 2009. Rapid assessment of neoformed compounds in nuts and sesame seeds by front-face fluorescence. *Food Chemistry*, 115:304–312.



AGRADECIMIENTOS

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



Control de antibióticos en la leche desde el tambo
Díaz David, D.C., Gasparotti, M.L, Nagel, O., Althaus R.L.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805- (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

El monitoreo de residuos de antibióticos en la leche en el tambo representa un desafío ya que obliga a controlar todos los animales tratados. El objetivo del trabajo fue evaluar un método microbiológico de cribado, simple y económico a implementar en el tambo para el control de residuos de antibióticos en leche. Se seleccionaron cuatro grupos de seis vacas para evaluar la eliminación de cefalexina, amoxicilina y ceftiofur, de diferentes formulaciones comerciales, en la leche. Las respuestas del método fueron analizadas en muestras individuales de los animales antes de recibir el tratamiento y durante los 5 días posteriores en los dos ordeños diarios. Se utilizó regresión logística para modelizar la curva de eliminación de los antimicrobianos. Se observó que la leche de vacas tratadas con amoxicilina inyectable y cefalexina-ceftiofur intramamarios puede ser comercializada desde el quinto ordeño, respetando los LMR, mientras que con ceftiofur inyectable lo es ya a partir del primer ordeño. La aplicación del test en muestras individuales permite controlar de forma continua a los animales tratados con antibióticos a un bajo costo, evitando sanciones a los productores y que la leche contaminada llegue a las empresas lácteas.

Palabras claves: Residuos de antibióticos, Leche, Eliminación, Período de retirada, Control en tambo.

ABSTRACT

The monitoring of antibiotic residues in farm milk represents a challenge since it requires the testing of all treated animals. The objective of this research was the evaluation of a simple and cheap microbiological screening method to be implemented on the farm for the control of antibiotic residues in milk. Four groups of six cows were selected to value the elimination of cephalexin, amoxicillin and ceftiofur in milk in different commercial formulations. The responses to the method were analyzed in individual samples from the animals before receiving the treatment and twice a day during the milking for the following 5 days. Logistic regression was used to modeling the elimination curve of antimicrobials. It was observed that the milk from the cows treated with injectable amoxicillin and intramammary cephalexin-ceftiofur can be retailed after the fifth milking, within the LMR, while with injectable ceftiofur it is already feasible after the first milking. The use of this test in individual samples allows the continuous checking of the animals treated with antibiotics with a low cost, thus avoiding fines to the farmers and preventing contaminated milk reaching the dairy industry.

Keywords: Residues of antibiotics, Milk, Elimination, Withdrawal period, Monitoring on-farm.

INTRODUCCIÓN

Las drogas antimicrobianas se han utilizado en la Medicina Veterinaria por más de cinco décadas. En el ganado lechero los antibióticos se administran principalmente para prevenir o tratar infecciones mamarias pero también se utilizan para el tratamiento de otras enfermedades como las metritis, enfermedades respiratorias, problemas podales y otras patologías (Sawant et al. 2005, Hill et al. 2009). En el ganado lechero, la presencia de residuos de antibióticos en la leche depende del nivel de producción, la presencia de enfermedad, la posología empleada, la naturaleza y concentración de los antibióticos y el tiempo de retiro (Larocque y Neville 1985, Seymour et al. 1988, Oliver et al. 1990, Molina et al. 2003), así como también del recuento de células somáticas (Literio et al. 2007). Respetar los períodos de retiro de la leche después del tratamiento con antibióticos representa una acción de control adecuada para prevenir la presencia de residuos en la leche. Este control es responsabilidad de los propietarios de los tambos para mejorar la seguridad de la leche desde la misma explotación (Berruga et al. 2003). En muchos casos la contaminación con antibióticos



de la leche se debe al escaso conocimiento sobre las dosis correspondientes, la forma de administración y el tiempo de retiro para cada antibiótico (Althaus, et al. 2001, Molina et al. 2003, Berruga et al. 2003).

La presencia de antibióticos en la leche es un problema de salud pública (Stead et al. 2008, Pengov et al. 2009) ya que algunas moléculas de antibióticos pueden causar dificultades asociadas con síntomas alérgicos, asma o shock anafiláctico (Currie et al. 1998, Gomesy Demoly 2005, Demoly y Romano 2005) así como resistencia microbiana (McManus 1997, Wilke et al. 2005). Además, algunos antibióticos pueden producir importantes pérdidas económicas en la industria láctea al inhibir los starters de cultivos con la modificación de las propiedades organolépticas de los productos fermentados (Packham et al. 2001, Berruga et al. 2007).

Para prevenir los problemas que afectan a la salud del consumidor y controlar la presencia de residuos de antibióticos en alimentos, la Unión Europea (Consejo Directivo 2009) y el Codex Alimentarius (2009) establecieron el Límite Máximo de Residuos (LMR) para una amplia variedad de moléculas químicas, incluidos los antibióticos (Comisión Reguladora 2010). La presencia de residuos en la leche en valores superiores a los establecidos por la legislación pueden generar penalidades que van desde sanciones económicas y hasta el cierre de mercados internacionales.

Para controlar los niveles de antimicrobianos en leche, las industrias lácteas utilizan principalmente test de cribado con base microbiológica y en muchos casos, implementan un chequeo rápido de residuos de antibióticos con métodos de unión a receptores como β -s.t.a.r. 1 + 1 (Reybroeck et al. 2010), Charm MRL β -lactam (Reybroeck et al. 2011) o Twinsensor^{BT} (Perme et al. 2010). Estos test se utilizan principalmente para la detección de betalactámicos y/o tetraciclinas. No obstante, debe tenerse en cuenta que este tipo de metodologías no son capaces de detectar otros antimicrobianos potencialmente presentes en la leche.

Los sistemas de aseguramiento de la inocuidad de alimentos como “Buenas Prácticas de Manufacturas” y “Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos” consideran importante que el tamboero verifique el estado de salud de los animales, disponga de la tecnología necesaria para mantener y mejorar la situación de la explotación y reduzca el riesgo de la presencia de residuos de antibióticos en la leche (Lievaert et al. 2005). No obstante, la ausencia de test validados para campo para una gran variedad de drogas antimicrobianas utilizadas en el tambo hace difícil garantizar el cumplimiento de las exigencias de este tipo de programas (Gardner 1997).

El objetivo de este estudio fue determinar el tiempo de retiro pre-ordeño de tres formulaciones de antimicrobianos, usando un test de inhibición microbiológica que utiliza *Geobacillus stearothermophilus* como bacteria test para monitorear la contaminación de la leche con ATBs antes del ingreso a la industria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales utilizados: En el estudio se seleccionaron 24 vacas Holando Argentino de 4 a 7 años de edad y una producción láctea de 26 +/- 4 litros por ordeño, pertenecientes a tambos del departamento Las Colonias (Provincia de Santa Fe, Argentina). Estas explotaciones tamberas están localizadas en 31° 28' de latitud sur y 60° 55' longitud oeste. El clima de la región es semihúmedo, con un rango de precipitación anual entre 652 y 1272 mm anuales, con temperaturas promedio entre 17 y 19°C.

Los animales se alimentaron durante el experimento con pastura de alfalfa implantada y suplementados con una mezcla de ensilado de maíz, granos de maíz, expeller de girasol y semillas de algodón. Las vacas clínicamente sanas se dividieron en cuatro grupos (A, B, C, D) con 6 animales en cada uno agrupados según su peso corporal, edad y producción láctea.

Grupo A: Grupo control sin tratamiento con antibióticos.

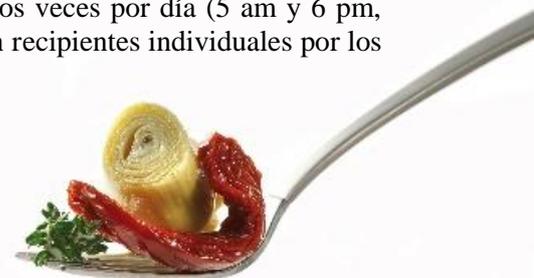
Grupo B: Tratados con una combinación de cefalexina- ceftiofur (100 mg ceftiofur - 100 mg cefalexina) por vía intramamaria. Una segunda dosis se aplicó a las 24 h.

Grupo C: Tratados con amoxicilina trihidrato (15 mg/kg p.v.) por vía intramuscular. Una segunda dosis se administró a las 48 h.

Grupo D: Tratados con ceftiofur clorhidrato (2,2 mg de ceftiofur/kg p.v.) por vía intramuscular.

El tratamiento se repitió a intervalos de 24 h, totalizando 4 administraciones.

Toma de muestras de leche: Previamente al primer tratamiento, y luego de finalizados los mismos, se tomaron muestras individuales de cada vaca durante 5 días consecutivos, dos veces por día (5 am y 6 pm, aproximadamente). Las muestras de leche de cada animal se recolectaron en recipientes individuales por los tamboeros, quienes recibieron entrenamiento específico.



Test de inhibición microbiológica: cada muestra de leche se analizó con el bioensayo microbiológico BT (Betalactámicos y tetraciclinas) en microtubos. El mismo contiene el medio PCA (Conteo en Placa de Agar, Biokar Diagnosticos, Beauvais, Francia), compuesto de peptona de caseína (5g/L), extracto de levadura (2,5 g/L), glucosa (1 g/L), agar (15 g/L), púrpura de bromocresol (0,05 mg/mL, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA), cloranfenicol (400 µg/L, Sigma-Aldrich, MO, USA) y 1×10^7 esporas/mL de *Geobacillus stearothermophilus* subsp. *calidolactis* C-953 (Merck®, Ref. 1.11 499, Darmstadt, Germany). Luego, 50 µL de leche se colocaron en cada microtubo de un rack. El rack se selló herméticamente con papel adhesivo y fue incubado a $64 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 h en baño termostático. Los resultados se interpretaron visualmente en términos dicotómicos (positivo: azul y negativo: amarillo). Se utilizó este método por presentar límites de detección (LD) similares a los Límites Máximos de Residuos (LMR) para amoxicilina (LD= 3,3 µg/l vs. LMR= 4 µg/l), cefalexina (LD= 54 µg/l vs. LMR= 100 µg/l) y ceftiofur (LD= 99 µg/l vs. LMR=100 µg/l) (Nagel et al. 2011).

Análisis Estadístico: Se utilizó el Modelo de Regresión logística (Agresti 1990) para el análisis del efecto de números de ordeños y la frecuencia de resultados positivos para los diferentes antibióticos. Se utilizó el procedimiento de logística del Sistema estadístico SAS® (SAS 2001) de acuerdo al siguiente modelo estadístico:

$$L_{ij} = \text{logit } [P_{ij}] = B_0 + B_1 [MO]_i + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

Donde: L_{ij} = modelo logístico lineal; $[P_{ij}] = \text{logit } [P_p/(1-P_p)]$: la probabilidad de la respuesta positiva/ la probabilidad de respuesta negativa; B_0, B_1 = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística; $[MO]_i$ = número de ordeño; ε_{ij} = error residual. El coeficiente de concordancia se aplicó como el rango de correlación entre las respuestas observadas y la probabilidad predictiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla 1** podemos observar los resultados obtenidos por el método microbiológico para cada grupo tratado. El grupo A corresponde al grupo control por lo tanto todos los resultados de las muestras son negativos. Observamos que para el grupo B, que corresponde a los animales que recibieron el tratamiento intramamario, presentan el total de las muestras de leche positivas en los 2 primeros ordeños posteriores al inóculo, siendo todas negativas al quinto ordeño. En el grupo C (los que recibieron amoxicilina inyectable) el test nos muestra que todas las muestras dieron positivas durante los tres ordeños consecutivos a la aplicación de la inyección y que a partir del quinto ordeño también dan todas negativas. En el caso del grupo D, que recibieron el ceftiofur de manera inyectable el método microbiológico muestra que en ningún ordeño se elimina el mismo en la leche dentro de los límites legislados.

Tabla 1. Resultados positivos al bioensayo microbiológico utilizado para evaluar los residuos de antibióticos en el tambo

Grupo	Número de ordeños										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A: Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B: Cefalexina-Ceftiofur	0	6	6	4	1	0	0	0	0	0	0
C: Amoxicilina	0	6	6	6	1	0	0	0	0	0	0
D: Ceftiofur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Número de animales tratados por grupo: n = 6.

En la **tabla 2** podemos observar los modelos de regresión logística obtenidos del método microbiológico para el grupo B y C, en los que se aprecia un alto valor de coeficientes de concordancia porcentual para ambos casos. Se toman solamente estos dos grupos ya que fueron los que mostraron respuestas positivas. En las **figuras 1 y 2** se puede observar la caída brusca de las respuestas positivas al bioensayo a partir del tercer ordeño, siendo la misma más marcada con el uso de la amoxicilina.



Tabla 2. Ecuaciones del modelo de regresión logística calculadas para el análisis de los residuos de antibióticos en leche de vacas tratadas

Grupo	logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [NO]	CP
B: Cefalexina-Ceftiofur	logit [P] = 9.61689 - 2.88869 [NO]	81.0
C: Amoxicilina	logit [P _{ij}] = 12.1657 - 3.4759 [NO]	98.5

[P] : Frecuencia de resultados positivos al bioensayo, [NO]: Número de ordeños, CP: coeficiente de concordancia porcentual.

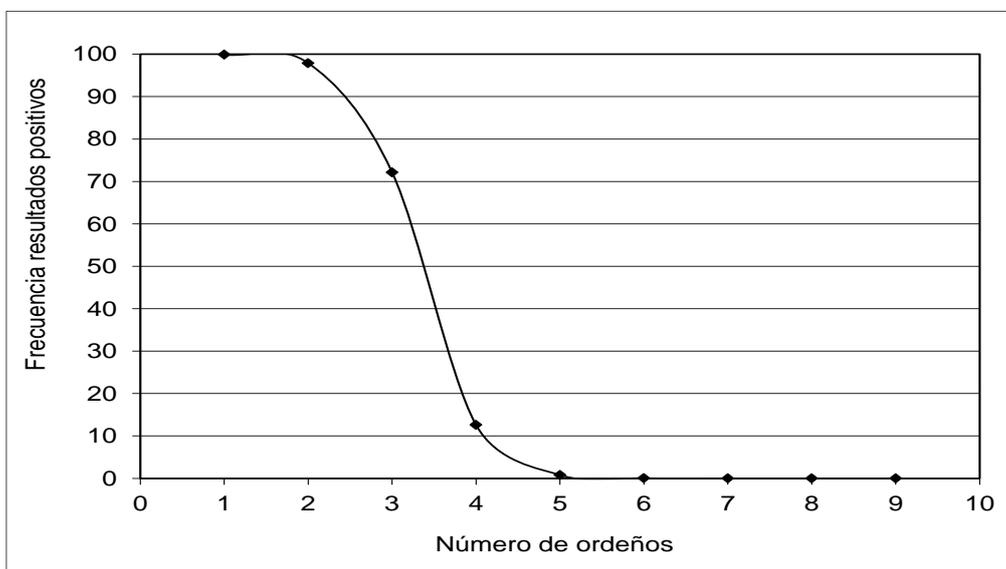


Figura 1. Efecto del tiempo de eliminación (número de ordeños) sobre las frecuencias de respuestas positivas al bioensayo microbiológico para animales tratados con cefalexina-ceftiofur.



Figura 2. Efecto del tiempo de eliminación (número de ordeños) sobre las frecuencias de respuestas positivas al bioensayo microbiológico para animales tratados con Amoxicilina.

Los resultados aquí presentados permiten evaluar la validez de un método microbiológico sencillo para la determinación de residuos de antibióticos en leche de vacas individuales. Al respecto, Schallibaum (1990) destaca que el 96,9% de la presencia de estos residuos en leche cruda se debe principalmente a falta de registros, omisiones y errores del personal del establecimiento. Estas frecuencias de residuos podrían disminuirse mediante la implementación de controles rutinarios con métodos microbiológicos en el tambo a



la leche de animales tratados con antibióticos. Al respecto, se debe destacar que estos métodos de screening resultan prácticos de aplicar en el tambo, puesto que los métodos cromatográficos tales como HPLC, HPLC-MS-MS, GC resultan impracticables (Anderson et al. 1998).

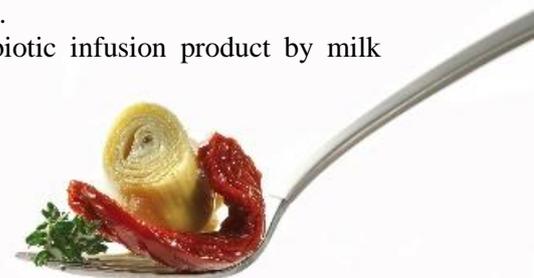
CONCLUSIÓN

La leche proveniente de vacas tratadas con cefalexina-ceftiofur (Grupo B) y amoxicilina (Grupo C) pueden comercializarse a las industrias lácteas a partir del quinto ordeño, mientras que la leche que proviene de animales tratados con ceftiofur inyectable (Grupo D) no presenta residuos superiores al LMR, por lo cual puede entregarse a la industria láctea luego de realizado el tratamiento.

A modo de síntesis, se puede establecer que la utilización de test de cribado en el tambo se presenta como una alternativa válida para ejercer un adecuado control de la materia prima que sale del establecimiento ganadero, evitando sanciones al productor. Además, esto redundará en beneficios económicos para la industria y reducirá la posibilidad de efectos nocivos sobre la salud de los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

- Agresti A. 1990. *Categorical Data Analysis*. New York. Wiley and sons inc. 588 pag.
- Althaus RL, Molina MP, Cubera I, Peris C., Fernandez N. 2001. Depletion time of antibiotic residues in milk from Manchega dairy ewes. Althaus R.L., Molina P., Soutullo H., Peris C., Martínez M., Fernández N. in Rubino R. (ed.), Morand-fehr P. (ed.). *Production systems and product quality in sheep and goats*. Zaragoza: CIHEAM Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 46: 20
- Anderson KL, Moats WA, Rushing JE, O'Carroll JM. 1998. Detection of milk antibiotic residues by use of screening tests and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicillin or penicillin G in cows with clinical mastitis. *American Journal of Veterinary Research*. 59(9):1096-1100.
- Berruga MI, Yamaki M, Althaus RL, Molina MP, Molina A. 2003. Performances of antibiotic screening tests in determining the persistence of penicillin residues in ewe's milk. *Journal of Food Protection*. 66 (11): 2097-2102.
- Berruga MI, Molina MP, Noves B, Roman M, Molina A. 2007. In vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft*. 62: 303-305.
- Codex Alimentarius. 2009 *Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods*. 32nd session of the July 2009. Roma, Italia.
- Commission Regulation. 2009. Commission Regulation (EU) n° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*. 2010; L 15: 1-72.
- Council Directive. 2009. Council Directive (EU) n° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*. 2009; L 15: 1-72.
- Currie D, Lynas L, Kennedy G, Mccaughey J. 1998. Evaluation of modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs. *Food Additives & Contaminants*. 15: 651-660.
- Demoly P, Romano A. 2005. Update on beta-lactam allergy diagnosis. *Current Allergy and Asthma Reports*. 1: 9-14.
- Gardner IA. 1997. Testing to Fulfill HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) Requirements: Principles and Examples. *Journal of Dairy Science*. 80 (12): 3453-3457.
- Gomes ER, Demoly P. 2005. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. 5: 309-316.
- Hill AE, Green AL, Wagner BA, Dargatz DA. 2009. Relationship between herd size and annual prevalence of and primary antimicrobial treatments for common diseases on dairy operations in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*. 88 (4): 264-277.
- ISO/TS 26844 (2006), IDF/RM 215. Milk and milk products. Determination of antimicrobial residues. Tube diffusion test. Technical Specification (ISO), International Organization for Standardization, Geneva (Switzerland); International Dairy Federation, Brussels, Belgium. 2006: 1-13.
- Larocque L, Neville GA. 1985 Quantitative evaluation of a bovine antibiotic infusion product by milk residue depletion studies. *Journal of Food Protection*. 48: 611-615.



- Lievaert J, Noordhuizen JPT, van Beek E, van der Beek C, van Risp A, Schenkel J, van Veersen J. 2005. The Hazard analysis critical control point (HACCP) concept as applied to some chemical, physical and microbiological contaminants of milk on dairy farms. A prototype. *Veterinary Quarterly*. 27(1): 21-29.
- Litterio NJ, Calvino LF, Flores MM, Tarabla HD, Boggio JC. 2007. Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts. *Journal of Veterinary Medicine*. 54: 30-35.
- McManus MC. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 54: 1420-1433.
- Molina A, Molina P, Althaus RL, Gallego L. 2003. Residues Persistence in Milk Following Antibiotics Treatment in Dairy Ewes. *The Veterinary Journal*. 16: 84-89.
- Nagel O, Molina MP, Althaus RL. 2011. Microbial System for Identification of Antibiotic Residues in Milk. *Journal of Food and Drug Analysis*. 19 (3): 369-375.
- Oliver SP, Maki JL, Dowlen HH. 1990. Antibiotic residues in milk following antimicrobial therapy during lactation. *Journal of Food Protection*. 53(8): 693-696.
- Packham W, Broome MC, Limsowtin GK. 2001. Roginski H. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology*. 56: 15-18.
- Pengov A, Kirbis A. 2009. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. *Analytica Chimica Acta*. 637: 3-7.
- Perme T, Bizjak M, Sinigoj Gacnik K, Kirbis A. 2010. Validation of Twinsensor^{BT} screening test for the detection of β -lactams and tetracyclines in milk and comparison to Delvotest[®] SP-NT. *Slovenian Veterinary Research*. 47 (3): 97-106.
- Reybroeck W, Ooghe S, Brabander HF, Daeseleire E. 2010. Validation of the β -s.t.a.r. 1+1 for rapid screening of residues of β -lactam antibiotics in milk. *Food Additives and Contaminants*. 27 (8): 1084-1095.
- Reybroeck W, Ooghe S, Brabander HF, Daeseleire E. 2011. Validation of the Charm MRL-3 for fast screening of β -Lactam antibiotics in raw milk. *Journal of AOAC International*. 94 (2): 373-382.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT[®] 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. SAS/STAT[®] 9.1 User's Guide Copyright[©] 2004, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA ISBN 1-59047-243-8
- Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*. 2005; 88 (8): 2991-2999.
- Schallibaum M. 1990. Antibiotikatherapie und Rückstände in der Anlieferungsmilch. *Swiss Vet* 7: 7-9.
- Seymour EH, Jones GM, Mc Gilliard ML. 1988. Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 71 (8): 2292-2296.
- Stead SL, Ashwin H, Richmond SF, Sharman M, Langeveld PC, Barendse JP, Stark J, Keely BJ. 2008. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *International Dairy Journal*. 18: 3-11.
- Merck. 2011. Topics in Antibacterial Agents. Penicillins in *The Merck Veterinary Manual*. Merck Sharp & Dohme Corp., Whitehouse Station, N.J., U.S.A. available in <http://www.merckvetmanual.com>.
- Wilke MS, Andrew L, Lovering AL, Strynadka NC. 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 525-533.



Efecto de la inactivación térmica de antibióticos sobre el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*

Eluk D.⁽¹⁾, Ceruti R.⁽¹⁾, Nágel O.⁽¹⁾, Althaus R.⁽¹⁾, Molina, M.P.⁽²⁾

⁽¹⁾ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805 - (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

⁽²⁾ Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n (46021) Valencia, España.

deluk@fcv.unl.edu.ar

RESUMEN

La fermentación de lactosuero contaminado con antibióticos para la obtención de levaduras representa una alternativa interesante para la depuración de este efluente. Sin embargo, residuos de antibióticos a niveles cercanos a los límites máximos de residuos afectan el crecimiento de estos microorganismos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la inactivación térmica (120°C-20 minutos) de 5 cefalosporinas, 3 quinolonas y 3 tetraciclinas, mediante inhibición al crecimiento celular y consumo de lactosa de *Kluyveromyces marxianus*. Se observó que la presencia de antibióticos reduce significativamente el desarrollo de *K. marxianus* y el consumo de lactosa respecto a un grupo control, mientras que las muestras tratadas térmicamente resultaron menos afectadas en estos parámetros. Se concluye que el tratamiento térmico a 120°C-20 minutos produce una inactivación significativa de ciprofloxacina, marbofloxacina, oxitetraciclina y tetraciclina. Se deberían ensayar otros tiempos de tratamiento térmico.

Palabras claves: leche, antibióticos, inactivación, *Kluyveromyces marxianus*, fermentación.

ABSTRACT

The fermentation of whey contaminated with antibiotics to obtain yeasts represents an interesting alternative for the purification of this effluent. However, antibiotic residues at levels close to their maximum residue limits affect the growth of these microorganisms. The objective of this study was to evaluate the thermal inactivation (120 ° C-20 minutes) of 5 cephalosporins, 3 quinolones and 3 tetracyclines, by the inhibition of cell growth and lactose consumption of *Kluyveromyces marxianus*. It was observed that the presence of antibiotics significantly reduced the development of *K. marxianus* and consumption of lactose compared to a control group, whereas the thermally treated samples were less affected in these parameters. It is concluded that heat treatment at 120°C-20 minutes produces a significant inactivation of some of ciprofloxacin, marbofloxacin, oxytetracycline and tetracycline. Other heat treatment times should be tested.

Key words: milk, antibiotics, inactivation, *Kluyveromyces marxianus*, fermentation.



INTRODUCCION

Los antibióticos (ATBs) se utilizan para el tratamiento de numerosas patologías del ganado vacuno productor de leche, tales como mastitis, metritis, neumonías, enteritis, etc. (Sawant et al., 2005; Cabello, 2006). Sin embargo, algunas moléculas de ATBs no son metabolizadas totalmente y pueden eliminarse a través de las heces, orina y leche (Topp et al., 2013; Ghava et al., 2015).

La presencia de residuos de antibióticos en leche y lactosuero constituye un problema tanto para los productores, como para el medio ambiente y la industria láctea. Sin embargo, debido a su contenido de nutrientes, el lactosuero debería considerarse como un recurso y no como efluente (Guimarães et al., 2010; Vamvakaki et al., 2010).

Entre los múltiples usos de este subproducto se destacan alimentación del ganado (Siso, 1996), derivados para la industria alimenticia, como por ejemplo productos de panadería, fórmulas para lactantes y barras deportivas (Balagtas et al., 2003) y la obtención de lactosa con fines farmacéuticos (Dake et al., 2012; Guerra et al., 2013). Asimismo, el procesamiento biotecnológico de lactosuero genera productos de interés para el sector agroindustrial, tales como bebida fermentadas, ácidos orgánicos (ácido láctico y propiónico) y proteínas microbianas (Mawson, 1994).

Otra alternativa consiste en utilizar este subproducto para la obtención de biomasa mediante procesos fermentativo con levaduras reduciendo también su carga orgánica al ambiente (Koutinas et al., 2009; Vamvakaki et al., 2010). Entre las diversas levaduras disponibles para el procesamiento de suero de leche, *K. marxianus* se utiliza ampliamente por su capacidad de asimilar la lactosa (Guimarães et al., 2010; Tabanelli et al., 2016).

Sin embargo, la capacidad de degradar la lactosa y el crecimiento de *K. marxianus* pueden ser afectadas por la presencia de residuos de antibióticos a niveles inferiores a los LMR (Althaus et al., 2014). Existen diversos trabajos que mencionan el tratamiento térmico para la inactivación de moléculas de ATBs. En este sentido, Zorraquino et al. (2008b) estudiaron la inactivación térmica de ATB betalactámicos a través de un bioensayo con *Geobacillus stearothermophilus* en muestras de leche. Los resultados revelaron que la esterilización (120°C-20 minutos) causó un nivel de inactivación del 65% en penicilinas y 90% para cefalosporinas. Para muestras de leche que contienen residuos de quinolonas, Zorraquino et al. (2008a) señalan que la esterilización (120°C-20 minutos) inactiva el 34% de marbofloxacina y el 32% de norfloxacina. De manera similar, Roca et al. (2010) evaluaron el efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre muestras de leche conteniendo quinolonas, mediante el empleo de equipos de análisis de cromatografía líquida con detección por fluorescencia. Los resultados mostraron la elevada termo-resistencia de estas moléculas durante el proceso de esterilización (120°C-20 minutos) con pérdidas del 13% para ciprofloxacina y 12% para norfloxacina. Por su parte Zorraquino et al. (2010), quienes estudiaron el efecto del calentamiento de muestras de leche conteniendo tetraciclinas mediante el empleo de un bioensayo de inhibición con *Bacillus cereus*, indican que el proceso de esterilización (120°C-20 minutos) produce pérdidas de actividad antimicrobiana del 90% para clortetraciclina, 84% para doxiciclina, 89% para oxitetraciclina y 91% para tetraciclina.

No se encuentra mucha información de inactivación de ATBs por tratamiento térmico (TT) en lactosuero ni sobre el efecto del mismo en el desarrollo de *K. marxianus*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento térmico (120°C-20 minutos) de muestras de suero contaminadas con distintos ATBs (5 cefalosporinas, 3 quinolonas y 3 tetraciclinas) sobre la la inhibición del desarrollo de *K. marxianus* y el consumo de lactosa en un medio de cultivo semisintético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medio de cultivo

Se preparó un medio semisintético a pH=6.5, conteniendo 4% p/v de lactosa (Sigma Aldrich, St. Lois, EEUU), 0,5% p/v de extracto de levadura (Merck Millipore, EEUU) y 2,5% p/v de peptona de caseína (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia).

Antibióticos

Se utilizaron 5 cefalosporinas (cefadroxil (Sigma C-7020), cefalexina (Sigma C-4895), cefoperazona (Sigma C-4292), ceftiofur (Pharmacia & Upjohn), cefuroxima (Sigma C-4417), 3 quinolonas (ciprofloxacina (Sigma 17850-F), enrofloxacina (Bayer), marbofloxacina (Vetoquinol) y 3 tetraciclinas (clortetraciclina (Sigma C-4881), oxitetraciclina (Sigma O-5750), tetraciclina (Sigma T-3258)). Las drogas se adquirieron en Sigma Aldrich (St. Lois, EEUU) y Pharmacia & Upjohn (Kalamazoo, EEUU). En todos los casos se trabajó con una



concentración de ATBs igual a los LMRs establecidos por Comunidad Europea (2009) y Codex Alimentarius (2010), siendo este límite de 100 µg/l para los ATBs ensayados, a excepción de marbofloxacin para la cual es de 75 µg/l.

Levadura

Se utilizó *K. marxianus* suministrada por la colección de cepas de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral).

Diseño experimental

Para el estudio fermentativo de cada antibiótico se utilizaron tres tipos de muestras: “A” sin antibiótico y sin tratamiento térmico, “B” con antibiótico y sin tratamiento térmico, “C” con antibiótico y con tratamiento térmico (120°C-20 minutos). Las fermentaciones se realizaron en 33 frascos de vidrio de boro silicato de 100 ml (3 frascos por cada antibiótico), utilizando 50 ml de medio de cultivo.

Se analizó la fermentación de *K. marxianus* (37°C y pH=6,5) durante 12 hs, realizando agitaciones cada 1 h y muestreos cada 2 hs para evaluar el crecimiento celular y el consumo de lactosa. El pH fue ajustado en cada muestreo con NaOH 1 N.

Crecimiento celular

El seguimiento del crecimiento celular se realizó a través de mediciones de Densidad Óptica (DO) a 620 nm utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis (Hamburg, Germany). Para esto, se tomaron muestra de 2 ml de cada frasco (por duplicado) y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. Luego, los sedimentos se re-suspendieron en igual volumen con solución fisiológica estéril y se midieron las absorbancias. Las lecturas se convirtieron a peso seco a utilizando una curva de calibración elaborada con suspensiones de DO creciente de *K. marxianus* y secadas en estufa 100°C durante 24hs. Los resultados se expresan en términos de gramos de biomasa por litro de medio (g/l).

Consumo de lactosa

La cuantificación de la lactosa fue realizada mediante una técnica enzimática colorimétrica basada en la hidrólisis de lactosa a galactosa y glucosa, utilizando la enzima β-galactosidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.E.U.U.) y posterior determinación enzimática-colorimétrica de la glucosa obtenida con un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina) en el que se produce un compuesto coloreado que se leyó a 505nm, utilizando un espectrofotómetro. Para interpretar los resultados en términos de consumo de lactosa, las mediciones fotométricas fueron expresadas en términos relativos a la concentración residual de lactosa según la expresión (1):

$$\%C = (C_x / C_0) 100 \quad (1)$$

donde: % C: concentración residual relativa, C_x: concentración de lactosa para la muestra a tiempo “x”, C₀: concentración de lactosa a tiempo inicial.

Análisis estadístico de los datos

Los resultados se analizaron utilizando la opción stepwise del Modelo de Regresión de segundo orden con interacción, mediante el procedimiento GLM (Regresión Lineal General) del paquete estadístico StatGraphics Centurion XVI (StatGraphics®, 2008). La ecuación (2) describe los efectos de tiempo, tipo de antibiótico y tratamiento térmico sobre la fermentación de *K. marxianus* es la siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 ATB + \beta_3 TT + \beta_{11} t^2 + \beta_{12} ATB * t + \beta_{13} TT * t + \beta_{112} ATB * t^2 + \beta_{113} TT * t^2 + \epsilon_{123} \quad (2)$$

dónde: Y = Modelo de Regresión Lineal General; β₀: Ordenada al origen, β₀, β₁, β₂, β₃, β₁₁, β₁₂, β₁₃, β₁₁₂, β₁₁₃: coeficientes estimados por el modelo, t: Efecto del tiempo de cultivo, t²: Efecto cuadrático del tiempo de cultivo, TT: Efecto del tratamiento térmico en términos de variables dummy (TT= 0: sin tratamiento térmico, TT= 1: tratamiento térmico de 120°C-20 min), ATB: Efecto de la presencia ATB en términos de variable dummy (ATB= 0: sin antibiótico, ATB= 1: con antibiótico a concentración equivalente al LMR) y ε₁₂₃ error residual del modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En **Tabla 1** se muestran las ecuaciones que relacionan los efectos del tratamiento térmico y de antibióticos sobre el crecimiento de *K. marxianus* y la concentración residual de lactosa en términos de sus factores significativos (p<0,05).



Tabla 1: Ecuaciones que relacionan los efectos del tratamiento térmico de antibióticos sobre el crecimiento *K. marxianus* y la concentración residual de lactosa

$$Y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_{11} t^2 + \beta_{12} \text{ATB} * t + \beta_{112} \text{ATB} * t^2 + \beta_{13} \text{TT} * t + \beta_{113} \text{TT} * t^2$$

Crecimiento		R_{aj}^2
Cefadroxil	$Y = 0,01871 + 0,00158 t^2 - 0,00242 \text{ATB} * t + 0,00016 \text{TT} * t^2$	99,96
Cefalexina	$Y = 0,02000 + 0,00146 t^2 - 0,00185 \text{ATB} * t$	98,91
Cefoperazona	$Y = 0,01956 + 0,00154 t^2 - 0,00186 \text{ATB} * t + 0,00007 \text{TT} * t^2$	99,05
Ceftiofur	$Y = 0,02044 + 0,00140 t^2 - 0,00025 \text{ATB} * t^2$	98,39
Cefuroxima	$Y = 0,01974 + 0,00147 t^2 - 0,00259 \text{ATB} * t + 0,00008 \text{TT} * t^2$	98,64
Ciprofloxacina	$Y = 0,03454 + 0,00105 t^2 + 0,00232 \text{ATB} * t - 0,00081 \text{ATB} * t^2 - 0,00154 \text{TT} * t + 0,00034 \text{TT} * t^2$	99,43
Enrofloxacin	$Y = 0,03441 + 0,00130 t^2 - 0,00015 \text{ATB} * t^2$	97,91
Marbofloxacina	$Y = 0,03461 + 0,00130 t^2 - 0,00042 \text{ATB} * t^2 + 0,00028 \text{TT} * t^2$	99,18
Clortetraciclina	$Y = 0,03390 + 0,00128 t^2 - 0,00033 \text{ATB} * t^2 + 0,00016 \text{TT} * t^2$	99,01
Oxitetraciclina	$Y = 0,03512 + 0,00111 t^2 - 0,00061 \text{ATB} * t^2 + 0,00028 \text{TT} * t^2$	99,41
Tetraciclina	$Y = 0,03596 + 0,00110 t^2 - 0,00061 \text{ATB} * t^2 + 0,00027 \text{TT} * t^2$	99,45
Concentración residual de lactosa		R_{aj}^2
Cefadroxil	$Y = 0,99217 + 0,01666 t - 0,00490 t^2 + 0,00618 \text{ATB} * t$	99,96
Cefalexina	$Y = 0,98829 + 0,01914 t - 0,00496 t^2 + 0,00761 \text{ATB} * t$	98,91
Cefoperazona	$Y = 1,01929 - 0,00369 t^2 + 0,00467 \text{ATB} * t$	99,05
Ceftiofur	$Y = 1,02164 - 0,00376 t^2 + 0,00427 \text{ATB} * t$	98,39
Cefuroxima	$Y = 0,99058 + 0,02020 t - 0,00513 t^2 + 0,00730 \text{ATB} * t$	98,64
Ciprofloxacina	$Y = 1,00512 - 0,00286 t^2 + 0,00143 \text{ATB} * t^2$	93,16
Enrofloxacin	$Y = 1,00219 - 0,00289 t^2 + 0,01003 \text{ATB} * t - 0,00694 \text{TT} * t$	90,14
Marbofloxacina	$Y = 1,01454 - 0,00324 t^2 + 0,00250 \text{ATB} * t^2 - 0,00136 \text{TT} * t^2$	93,67
Clortetraciclina	$Y = 1,01378 - 0,00282 t^2 + 0,00884 \text{ATB} * t - 0,00409 \text{TT} * t$	93,24
Oxitetraciclina	$Y = 1,01662 - 0,00260 t^2 + 0,00121 \text{ATB} * t^2 - 0,00421 \text{TT} * t^2$	89,98
Tetraciclina	$Y = 1,01844 - 0,00242 t^2 + 0,00163 \text{ATB} * t^2 - 0,00064 \text{TT} * t^2$	94,66

t: tiempo; t²: cuadrado del tiempo; ATB: antibiótico; TT: tratamiento térmico; R_{aj}²: coeficiente de regresión porcentual ajustado

Cefalosporinas

De lo expuesto en **Tabla 1** para cefalosporinas, se destacan los elevados coeficientes de regresión ajustados (98%) que demuestran un adecuado ajuste del modelo. Los coeficientes positivos del tiempo cuadrado (β_{11}) señalan un incremento del crecimiento celular conforme avanza el tiempo de fermentación, mientras que la concentración de lactosa disminuye con el cuadrado del tiempo, debido a sus coeficientes negativos.

La acción inhibitoria de las cefalosporinas sobre el crecimiento celular se manifiesta mediante los coeficientes que contienen la interacción de ATBs con el tiempo (cefadroxil, cefalexina, cefoperazona y cefuroxima) y la interacción de ATBs con el cuadrado del tiempo (ceftiofur), observándose un descenso en la producción de biomasa y el consecuente aumento en la concentración residual de lactosa cuando se incrementa el tiempo de cultivo.

El efecto del tratamiento térmico a 120°C- 20 minutos (coeficiente β_{113}), resultó significativo para cefadroxil, cefoperazona y cefuroxime, indicando que dicho tratamiento altera la actividad antibacteriana de estos antimicrobianos, la cual se manifiesta mediante un incremento en biomasa comparado con aquellos cultivos los cuales no fueron tratados térmicamente. Por el contrario, los niveles residuales de lactosa no se vieron afectados por estos procesos térmicos (120°C-20 minutos).

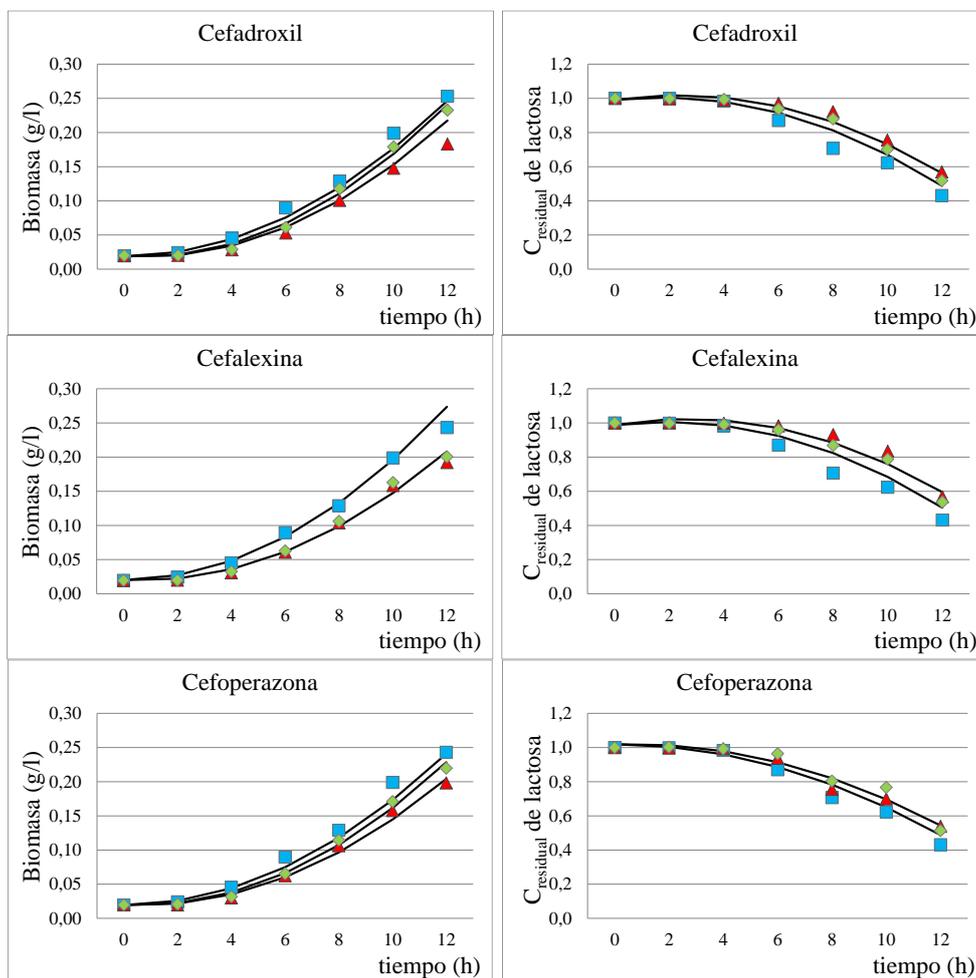
Con el propósito de visualizar los efectos del tratamiento térmico de cefalosporinas sobre el crecimiento de *K. marxianus* y la concentración residual relativa de lactosa se construyó la **Figura 1**. Como se mencionó anteriormente la presencia de cefalosporinas produce una disminución en la producción de levadura y en el consumo de lactosa, con respecto al grupo control para cefadroxil (25%, 14%), cefoperazona (18%, 11%) y cefuroxima (27%, 14%). Asimismo, para al tratamiento térmico, se evidencia que las muestras calentadas presentaron menores crecimiento celular y consumo de lactosa, con respecto al grupo control para cefadroxil (4%, 9%), cefoperazona (10%, 8%), cefuroxima (18%, 11%), mientras que cefalexina y ceftiofur no fueron afectadas por dicho proceso de calentamiento. Una inhibición de la actividad antimicrobiana similar a la



observada en este trabajo para cefalosporinas, fue reportada Zorraquino et al. (2008b) quienes señalan su termolabilidad con inactivaciones cercanas al 90% en muestras de leche calentadas a 120°C-20 minutos.

Quinolonas

Los coeficientes de regresión ajustados (R_{aj}^2) presentados en **Tabla 1** para quinolonas, fueron superiores al 90% lo cual demuestra el buen ajuste obtenido. La evolución del proceso fermentativo, que genera un aumento de concentración de biomasa y la consecuente disminución de la concentración de lactosa residual, queda expresada en el modelo a través de los coeficientes del tiempo cuadrado (β_{11}). La inhibición que experimenta el desarrollo de *K. marxianus* en presencia de quinolonas se manifiesta a través de los términos que relacionan los ATBs con el tiempo (β_{12}) y los ATBs con el tiempo cuadrado (β_{112}). El calentamiento (120°C-20 minutos) de las muestras con ATBs fue significativo para ciprofloxacina y marbofloxacina, pero no para enrofloxacin. El resultado de la inactivación parcial de estos ATBs se evidencia a través de los coeficientes que relacionan el tratamiento térmico con el cuadrado del tiempo (β_{113}), mostrando esto un incremento de la masa celular respecto de las muestras sin tratamiento. Sin embargo, el consumo de lactosa por parte de la levadura se ve disminuida por la presencia de quinolonas en el medio de cultivo (coeficientes β_{112} positivos). Al contrario, si muestras con enrofloxacin y marbofloxacina son sometidas a un tratamiento térmico de 120°C-20 min, se produce una inactivación de estos antibióticos (coeficientes β_{13} y β_{113} negativos) y por consiguiente un incremento en los niveles de lactosa residual



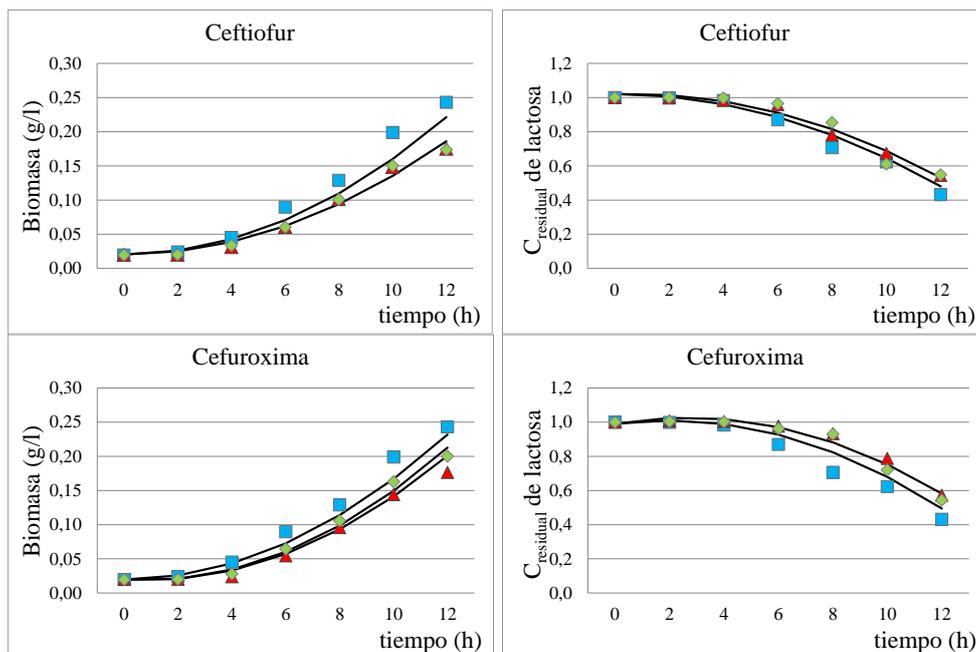


Figura 1: Efecto del tratamiento térmico (120°C-20 minutos) de cefalosporinas sobre el crecimiento de *K. marxianus* (izquierda) y la concentración residual de lactosa (derecha) (■ sin ATB-sin TT; ▲ con ATB-sin TT; ◆ con ATB-con TT).

La **Figura 2** muestra el efecto del tratamiento térmico (120°C-20 minutos) de quinolonas sobre la producción de masa celular de *K. marxianus* y la concentración residual de lactosa durante la fermentación (12 hs). De manera similar a lo observado con cefalosporinas, en estas gráficas es posible apreciar la acción inhibitoria de quinolonas, las cuales dificultan el desarrollo de la levadura respecto del grupo control. Asimismo, se resalta inactivación parcial debida al tratamiento térmico, significativa ($p < 0,05$) para ciprofloxacina y enrofloxacina, con incrementos en la concentración final de biomasa de 30% y 32%, respectivamente.

Los resultados de este estudio muestran inactivaciones similares a las señaladas por Zorraquino et al. (2008a) para marbofloxacina (34%) y Roca et al. (2010) para ciprofloxacina (13%) cuando esterilizan muestras de leche.



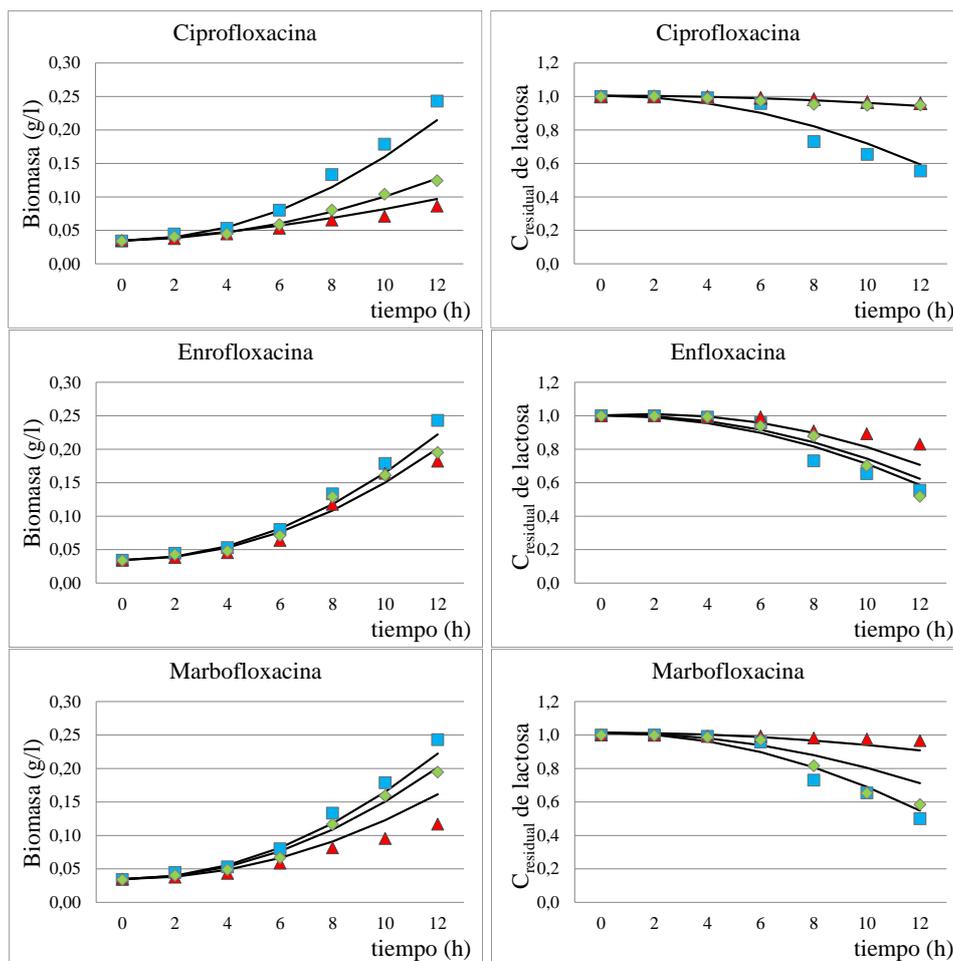


Figura 2: Efecto de quinolonas y del tratamiento térmico (120°C-20 minutos) sobre el crecimiento de *K. marxianus* (izquierda) y la concentración residual de lactosa (derecha) (■ sin ATB-sin TT; ▲ con ATB-sin TT; ◆ con ATB-con TT)

Tetraciclinas

Los coeficientes de regresión ajustados (R_{aj}^2) para tetraciclinas presentados en **Tabla 1** fueron adecuados (superiores al 89%). El incremento de la concentración de levaduras y la disminución de la concentración residual de lactosa se expone en términos de los factores cuadráticos del tiempo (β_{11}). La sensibilidad de *K. marxianus* a tetraciclinas se muestra a través de los coeficientes que relacionan los ATBs con t^2 (β_{11}) y se manifiesta con un descenso en la producción de biomasa respecto del grupo control (sin ATBs). Asimismo, se observa un incremento de la concentración residual de lactosa el cual se expresa a través de los coeficientes que vinculan los ATBs y el tiempo (clortetraciclina) o con el tiempo cuadrado (oxitetraciclina y tetraciclinas). La termolabilidad de todas las tetraciclinas ensayadas se ve reflejada luego del calentamiento (120°C-20 minutos) en un incremento de la producción celular respecto del grupo no calentado, y se exhibe a través de los términos que vinculan el tratamiento térmico con el cuadrado del tiempo (β_{113}). Asimismo, la concentración residual de lactosa disminuye lo que se demuestra a través de los coeficientes que vinculan el TT con el tiempo (clortetraciclina) o el tiempo cuadrado (oxitetraciclina y tetraciclinas).

El efecto del TT de tetraciclinas sobre el desarrollo de *K. marxianus* y la concentración residual relativa de lactosa se presentan en **Figura 3**.



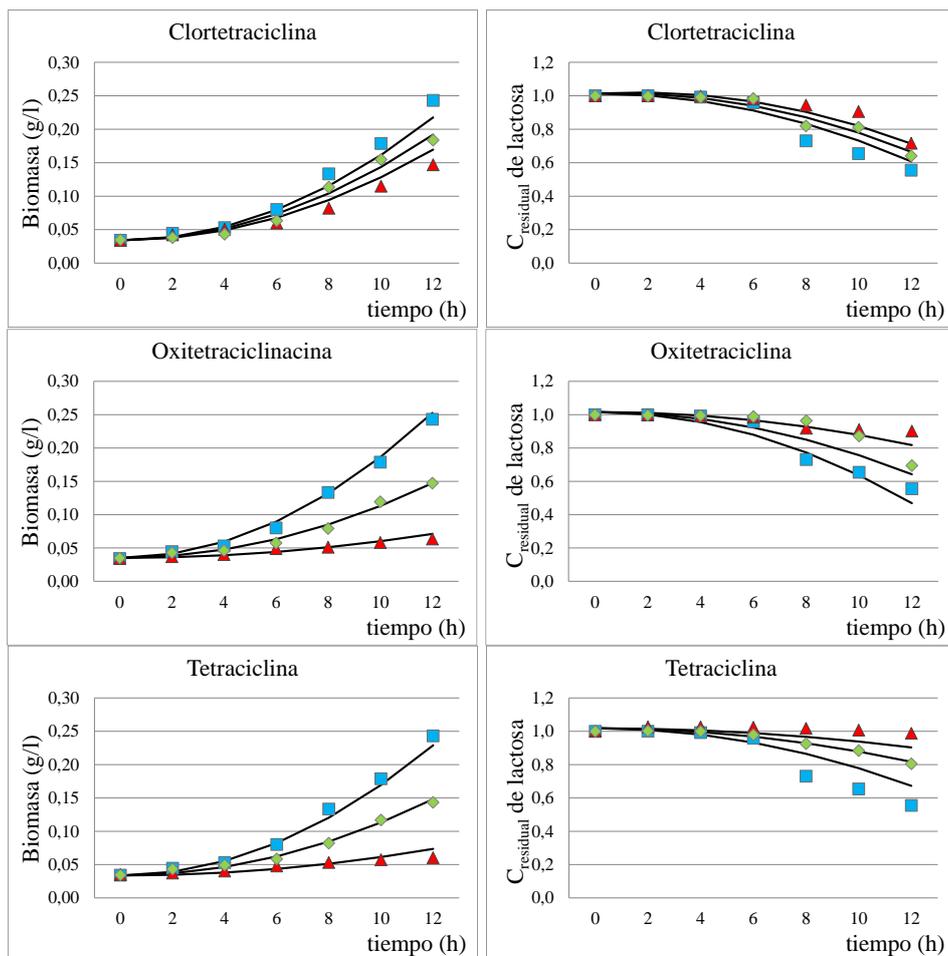


Figura 3: Efecto de tetraciclinas y del tratamiento térmico (120°C-20 minutos) sobre el crecimiento de *K. marxianus* (izquierda) y la concentración residual de lactosa (derecha) (■ sin ATB-sin TT; ▲ con ATB-sin TT; ◆ con ATB-con TT; — ajuste obtenido con el modelo)

En la **Figura 3** se expone la acción antimicrobiana de clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina sobre *K. marxianus*, pero también su termolabilidad, la cual se manifiesta con incrementos en la producción de biomasa respecto del grupo sin ATBs. En efecto las muestras calentadas tuvieron menores porcentajes de disminución del crecimiento celular, con respecto al grupo control: 24% vs. 40% para clortetraciclina, 39% vs. 74% para oxitetraciclina y 41% vs. 75% para tetraciclina. La elevada inactivación térmica de las tetraciclinas ensayadas en este trabajo también fue reportada por Zorraquino et al. (2010) quienes evaluaron la esterilización de muestras de leche conteniendo tetraciclinas obteniendo pérdidas de actividad antimicrobiana del 90% para clortetraciclina, 89% para oxitetraciclina y 91% para tetraciclina.

CONCLUSIONES

Se concluye el tratamiento térmico a 120°C-20 minutos produce una inactivación significativa ($p < 0.05$) de ciprofloxacina, marbofloxacina, oxitetraciclina y tetraciclina. Efectivamente, se observa que las muestras calentadas presentaron menores crecimientos celulares y consumo de lactosa. Futuros estudios contemplando tiempos de tratamiento térmico mayores deberían ser evaluados a fin de aumentar la inactivación de estos antibióticos.

BIBLIOGRAFIA

Althaus R, Nagel O, Eluk D, Molina P. 2014. Efecto del tratamiento térmico de suero de leche contaminado con quinolonas sobre la fermentación de *K. marxianus*. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina. p.135.



- Balagtas JV, Hutchinson FM, Krochta, JM, Sumner DA. 2003. Anticipating market effects of new uses for whey and evaluating returns to research and development. *Journal of Dairy Science*. 86(5) 1662-1672
- Cabello FC. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137-1144.
- Codex Alimentarius. 2010. Codex committee on residues of veterinary drugs in foods. 9th session of the 30 August – 3 September 2010. Discussion paper on methods of analysis for residues of veterinary drugs in foods (CX/RVDF 10/19/6). Vermont, USA. Available on line: ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdf19/rv19_06e.pdf
- Comunidad Europea. 2009. Council Regulation N°37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, 15: 1-72.
- Dake MS, Puntambekar AN, Amarpurkar SV. 2012. Induction of β -Glucanase from whey yeast. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2, 263-268.
- Ghava K, Rathod MC, Dhale DA. 2015. Effect of antibiotics on seed germination and root elongation of wheat. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(1): 516-527.
- Guerra AVA, Castro LMM, Tovar ALQ. 2013. Utilization of whey as a source of nutritional energy to minimize the problem of environmental pollution. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2).
- Guimarães PM, Teixeira JA, Domingues L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3): 375-384.
- Koutinas AA, Papapostolou H, Dimitrellou D, Kopsahelis N, Katechaki E, Bekatorou A, Bosnea LA. 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*. 100(15): 3734-3739.
- Mawson AJ. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology* 47(3) 195-203.
- Roca M, Castillo M, Martí P, Althaus RL, Molina MP. 2010. Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 12, 58(9): 5427-5431.
- Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM. 2005. A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 88: 2991-2999
- Siso MG. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. 57(1) 1-11.
- Tabanelli G, Verardo V, Pasini F, Cavina P, Lanciotti R, Caboni MF, Gardini F, Montanari C. 2016. Survival of the functional yeast *Kluyveromyces marxianus* B0399 in fermented milk with added sorbic acid. *Journal of dairy science*, 99(1), 120-129.
- Topp E, Chapman R, Devers-Lamrani M, Hartmann A, Marti R, Martin-Laurent F, Sabourin L, Scott A, Sumarah M. 2013. Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading sp. *Journal of environmental quality*, 42(1): 173-178.
- Vamvakaki AN, Kandarakis I, Kaminarides S, Komaitis M y Papanikolaou S. 2010. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Engineering in Life Sciences*. 10(4): 348-360.
- Zorraquino MA, Althaus RL, Nagel OG, Roca M, Molina P. 2010. Efecto de los Tratamientos Térmicos sobre la Actividad Antimicrobiana de Tetraciclinas en Leche. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral*. 9 (2): 47-56.
- Zorraquino MA, Roca M, Castillo M, Althaus RL, Molina MP. 2008a. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft*. 63: 192-195.
- Zorraquino MA, Roca M, Fernandez N, Molina MP, Althaus RL. 2008b. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *J. Food Prot*. 71 (6): 1193-1198.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Litoral y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento recibido.



Incorporación de fructooligosacáridos en películas bioactivas de suero de leche

Figueredo A.^{1,3}, Maldonado S.¹, Bertuzzi M.A.²

¹Ingeniería para el Desarrollo de la Agroindustria Regional (IDeAR). Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos (CITA) Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Jujuy.

² Instituto de Investigaciones para la Ingeniería Química (INIQUI-CONICET) Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta.

smaldonado@fi.unju.edu.ar

³ CONICET

RESUMEN

Se estudió la incorporación de fructooligosacáridos (FOS) como agente prebiótico, en una matriz de aislado de proteína de suero (APS) para obtener una película comestible bioactiva. Ésta se formuló con un 10% de APS, 40% glicerol y FOS: 0 (control), 30, 40, y 50% p/p de APS. Se evaluaron sus propiedades mecánicas y su permeabilidad al vapor de agua (PVA). El esfuerzo de rotura registrado (MPa) en cada caso fue de $3,49 \pm 0,12$; $2,31 \pm 0,33$; $0,26 \pm 0,03$ y $0,23 \pm 0,02$, para 0, 30, 40 y 50% de FOS, respectivamente. El % elongación fue: $12,30 \pm 1,55$; $14,63 \pm 0,12$; $15,27 \pm 0,28$ y $18,54 \pm 1,67$ y el módulo elástico (Pa/mm): $4,08 \pm 0,94$; $2,53 \pm 0,28$; $1,69 \pm 0,06$ y $1,44 \pm 0,15$. Para la PVA se obtuvo: $1,46E-09$; $9,10E-13$; $8,78E-13$ y $1,29E-12 \text{ gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$. Tanto el esfuerzo de ruptura como el módulo elástico disminuyen cuando la concentración de FOS aumenta hasta 40%, mientras que el porcentaje de elongación aumenta con los FOS. La PVA aumenta cuando el contenido de FOS es del 50%. Los resultados indican que una incorporación de hasta un 40% de FOS permitiría obtener una película de APS con adecuadas propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua y constituiría un adecuado vehículo para la incorporación FOS, como un aporte nutricional.

Palabras Clave: Películas activas, Fructooligosacáridos, Propiedades mecánicas, Permeabilidad al vapor de agua.

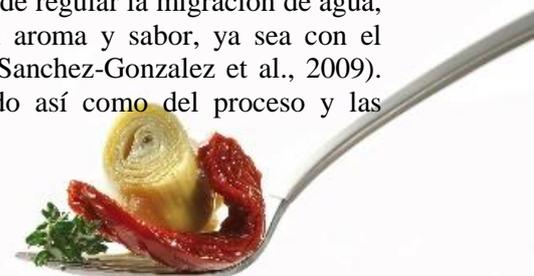
ABSTRACT

We studied the addition of fructooligosaccharides (FOS) to a whey protein isolate (APS) matrix, with the aim of obtain a bioactive edible film. The film was prepared with 10% APS, 40% glycerol and FOS: 0 (control), 30, 40, and 50% w/w of APS. Mechanical properties and water vapor permeability (PVA) were evaluated. The maximum tensile strength (MPa) were: 3.49 ± 0.12 ; 2.31 ± 0.33 ; 0.26 ± 0.03 ; 0.23 ± 0.02 for 0, 30, 40 and 50% of FOS, respectively. The values of percentage elongation were: 12.30 ± 1.55 ; 14.63 ± 0.12 ; 15.27 ± 0.28 and 18.54 ± 1.67 . The values of elastic modulus (Pa / mm) were: 4.08 ± 0.94 ; 2.53 ± 0.28 ; 1.69 ± 0.06 and 1.44 ± 0.15 . The PVA values were: $1.46 \text{ E}-09$; $9.10\text{E}-13$; $8.78\text{E}-13$ $1.29\text{E}-12 \text{ gm}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Both, tensile strength and elastic modulus, decreased significantly when FOS concentration increased up to 40%. Percentage of elongation increased with FOS concentration. The PVA values increased significantly when FOS content reached to 50%. The results indicate that the incorporation of up to 40% FOS would provide APS films with good mechanical and barrier properties which also constitute a suitable carrier for FOS, as a significant nutritional contribution.

Keywords: Active Films, Fructooligosaccharides, Mechanical Properties, Water vapor permeability.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los envases utilizados para la protección de alimentos están hechos de materiales derivados del petróleo. La durabilidad de estos materiales, condición buscada en su formulación inicial, se convirtió en un gran problema ambiental. Debido a esta situación es que ha crecido el interés en el uso de envases biodegradables, por lo que ha tomado gran significancia el desarrollo de nuevos envases a partir de biopolímeros de origen natural. Las películas comestibles deben ser capaces de regular la migración de agua, oxígeno, dióxido de carbono, lípidos y compuestos volátiles asociados al aroma y sabor, ya sea con el entorno o entre componentes de los productos alimenticios heterogéneos (Sanchez-Gonzalez et al., 2009). Las propiedades de cada película dependen del tipo de material utilizado así como del proceso y las



condiciones empleadas para su elaboración, las que a su vez determinan sus aplicaciones (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Rao et al., 2010). Las proteínas (tales como caseinatos, gelatina y proteínas de suero de leche) son biopolímeros potencialmente utilizables con este fin, ya que por lo general presentan buenas propiedades de barrera a los gases como el oxígeno y el dióxido de carbono (Han y Gennadios, 2005). Además, las películas biodegradables y comestibles pueden mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos envasados, complementar su valor nutritivo y transportar agentes microbianos y antioxidantes.

La proteína de suero de leche se ha empleado con éxito como materia prima para la elaboración de films con excelentes propiedades de barrera (Kadam et al, 2013) comparables a las de las mejores películas en base a los polímeros sintéticos disponibles, como por ejemplo polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de alta densidad, alcohol vinílico, cloruro de polivinilideno (PVDC), celofán y poliéster (Ramos et al., 2012; Khwaldia et al., 2004; Pérez-Gago y Krochta, 2002).

El suero lácteo contiene no sólo las proteínas solubles de la leche y azúcares, sino también metabolitos microbianos producidos durante el proceso de fermentación que presentan capacidad inmunomoduladora (Vinderola, 2008), lo que brindaría una funcionalidad probiótica adicional a la película

Muchas sustancias se han incorporado a las películas de suero de leche con el objeto de complementar sus propiedades de barrera y añadir funcionalidad. Janjarasskul et al. (2014) incorporaron cera candelilla a películas de proteína de suero y encontraron que su adición produce una disminución tanto en la permeabilidad al vapor de agua como al oxígeno, aunque ésta última en menor proporción. Leuangskurerk et al. (2014) evaluaron el efecto de la incorporación de galactomananos sobre la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua de películas de proteína de suero, aunque no obtuvieron efectos significativos sobre la permeabilidad encontraron un aumento de la solubilidad en agua y de la opacidad de las películas. Osés et al. (2009) estudiaron el efecto del agregado de goma mezquite sobre películas de suero de leche observando que esta goma no afecta de forma significativa las propiedades de barrera al vapor de agua.

Uno de los componentes que pueden incorporarse en la formulación de películas, por su gran interés para la zona, son los fructooligosacáridos (FOS). Estos son compuestos solubles en agua, de sabor dulce, con propiedades prebióticas y que además pueden utilizarse como sustituto de la sacarosa, ya que poseen aproximadamente el 30% de su dulzor (Coussement, 1999; Niness, 1999). La utilización de FOS en la formulación de películas produciría interacciones con las proteínas que podrían mejorar las propiedades funcionales de la matriz biopolimérica. Castro et al. (2010) utilizaron FOS en un recubrimiento comestible sobre uchuvas (*Physalis peruviana*) (0,1 mg de FOS / g de uchuva), encontrando que la adición de FOS aporta un 8% más de fibra, sin embargo es necesario tener en cuenta que dado el comportamiento de fibra dietaria que presentan los FOS en el tracto digestivo, se requiere conocer el límite máximo tolerado para su inclusión en la formulación de películas. Con respecto a esto, algunos autores (Ojansivu et al., 2011; Genta et al., 2009) reportaron que un consumo mayor a 0,14 g/kg de peso corporal/día (9,8 g/día para una persona de 70 kg) produce efectos indeseables sobre la salud gastrointestinal. Asimismo, en cuanto a las recomendaciones de ingesta de fructanos, informados por Roberfroid (2002), se desprende que la recomendación nutricional para consumo de fructanos, inulina y oligofructosa presenta diferencias entre países, por ejemplo en Estados Unidos el consumo diario recomendado es de 1 a 4 g/día mientras que en Europa se sugiere un consumo de 3 a 11 g/día.

En este trabajo se propone formular una película en base a aislado de suero lácteo, evaluando el efecto de la proporción de FOS agregados sobre sus propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se usó un aislado de suero de leche bovina provisto por la marca Provon de Glanbia Nutritional (>90% de proteínas) y glicerol de grado analítico al 87% marca Anedra. Se utilizaron fructooligosacáridos (93,2% de pureza) provistos por Orafit de Beneo.

Preparación del film

La película se formuló usando aislado de suero de leche al 10% p/p en agua destilada. Se agitó durante una hora a 215 rpm en un agitador orbital (Vicking Modelo M-23), se ajustó el pH a 7 con solución de NaOH 0,1 N y se calentó a 85°C durante 7 minutos para inducir la desnaturalización de las proteínas del lactosuero. Luego de enfriar se agregó glicerol en una proporción del 40 % p/p, en relación al peso de aislado de suero utilizado, teniendo en cuenta estudios realizados anteriormente. Los FOS se agregaron en las siguientes



proporciones: 0 (muestra control), 30, 40 y 50% p/p de polímero. Se colocaron 15 ml de la solución filmogénica en cajas de Petri previamente acondicionadas y se dejó secar a temperatura ambiente.

Permeabilidad al vapor de agua

Se determinó la permeabilidad al vapor de agua (PVA) siguiendo el método ASTM E96 “Standard test methods for water vapor transmission of materials”, en un ambiente con T y HR controladas. Se determinó el flujo de vapor de agua a través de la película, una vez alcanzado el estado estacionario en las condiciones de ensayo (Bertuzzi et al., 2007). Se acondicionaron muestras de película durante 48 h en un desecador a 25°C y 52% HR, mediante una solución sobresaturada de Mg (NO₃)₂. Las películas se colocaron en las celdas de permeación con agua destilada. A su vez las celdas se ubicaron en un desecador mantenido a temperatura constante de 25°C y humedad relativa del 0% (sílica gel). Se utilizó un ventilador para mantener condiciones uniformes. Se tomó el peso de las películas en función del tiempo, calculándose la variación de peso. Los datos obtenidos para cada tiempo, se ajustaron mediante regresión lineal, determinándose la pendiente (G). La PVA se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$PVA = (G \times x) / (A \times \Delta P) \quad (1)$$

donde

G: es la pendiente de la recta de la variación del peso en función del tiempo; x: espesor de la película; A: área de la película expuesta y Δp : diferencia de presión parcial de vapor de agua a través de la película.

Propiedades mecánicas

La determinación de las propiedades mecánicas de las películas se basó en la técnica ASTM D882-91 “Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting”. Para realizar los ensayos de tracción se utilizó un texturómetro Brockfield (England). Se midió la fuerza requerida por el equipo para estirar, a velocidad constante, una muestra rectangular ubicada entre dos conjuntos de grampas paralelas. Las muestras se cortaron en tiras de 25,0 mm de ancho y longitud determinada. Los extremos de las tiras se ubicaron sobre rectángulos de cartulina mediante cinta doble adhesiva para mejorar la sujeción de las mordazas. El texturómetro se utilizó en el modo tracción con una velocidad de separación de las mordazas de 20 mm/min y una separación inicial de 50 mm. Las propiedades mecánicas de las películas se obtuvieron a partir de las curvas fuerza-desplazamiento registradas, como:

Esfuerzo de tracción (ET): se calculó dividiendo la carga máxima por la mínima sección transversal original de la muestra. El resultado se expresó en fuerza por unidad de área (MPa)

% de elongación en el punto de rotura (E): se calculó dividiendo la extensión en el momento de rotura de la muestra por la longitud inicial y se multiplicó por 100. Se utilizó la distancia entre las grampas.

Módulo elástico: se calculó mediante la tangente a la porción lineal inicial de la curva fuerza-desplazamiento.

Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron con el Software Graph Pad Prism. Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95%, usando el programa Statgraphics Centurion XV.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación del film

Las películas de proteína de suero obtenidas con el agregado de fructooligosacáridos resultaron transparentes, lisas, flexibles, homogéneas y sin poros o grietas. No se observaron cambios en la apariencia de las películas con las distintas concentraciones de FOS agregadas. El aspecto del lado de la película en roce con las placas de Petri fue ligeramente mate, mientras que las expuestas al calor de secado fueron brillantes.



Figura 1. Aspecto macroscópico de las películas preparadas

Permeabilidad al vapor de agua

Los valores de PVA se presentan en la **Tabla 1**:

Tabla 1. PVA obtenidas para películas de aislado de proteína de suero con FOS

%FOS	PVA (g/msPa)
0	1,46E-09 ^a ±1,10E-10
30	9,10E-13 ^b ±3,84E-14
40	8,78E-13 ^b ±1,57E-14
50	1,29E-12 ^c ±1,24E-13

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

77

Se puede observar en la **Tabla 1** que la permeabilidad al vapor de agua aumenta con la incorporación de FOS en la matriz polimérica de suero de leche. El aumento en la PVA se observa cuando se añaden FOS al 30%, luego no se observan cambios estadísticamente significativos cuando se incorpora un 40% de FOS y nuevamente aumenta la PVA cuando el contenido de FOS asciende al 50%.

Comparando los valores de PVA con las obtenidas por otros autores, se observa que la película de APS control (0% FOS) tiene PVA en el mismo orden de magnitud que los reportados. Al respecto Zinoviadou et al. (2010) informaron valores de PVA de 2,38E-09 g/(m.s.Pa) usando en la formulación un 37,5% de sorbitol, valores que están en el mismo orden de los informados para películas de APS plastificadas con un 50% de glicerol 1,14E-09g / (m.s.Pa) (Wang et al., 2008). Si se comparan los valores de PVA obtenidos con los de los envases de polietileno de baja densidad (7,3 a 9,7 10⁻¹³ g/(m.s.Pa)) y los de polietileno de alta densidad (2,4 10⁻¹³ g/(m.s.Pa)) (Gennadios et al., 1994; Krochta, 1992), se observa que las películas de APS con FOS presentan similares valores de permeabilidad al vapor de agua que las de polietileno.

Propiedades mecánicas

En la **Tabla 2** se reflejan los valores de las propiedades mecánicas (Esfuerzo de tracción, % Elongación y Módulo elástico) de películas en base a APS con el agregado de FOS, obtenidos a partir de las curvas fuerza-desplazamiento:

Tabla 2. Propiedades mecánicas de películas de aislado de suero de leche y FOS

%FOS	Esfuerzo (MPa)	% Elongación	Módulo elástico
0	3,49 ^a ±0,12	13,20 ^a ±1,94	4,08 ^a ±0,94
30	2,31 ^b ±0,33	15,51 ^a ±4,82	2,53 ^b ±0,28
40	0,26 ^c ±0,03	13,78 ^a ±1,55	1,69 ^{bc} ±0,06
50	0,23 ^c ±0,02	18,04 ^b ±1,69	1,44 ^c ±0,15

Medias con letras iguales no representan diferencias significativas ($p < 0,05$)



Como puede observarse en la **Tabla 2**, hay una marcada disminución del esfuerzo de ruptura conforme aumenta la cantidad de FOS añadidos hasta el 40%. Esta disminución puede deberse al efecto plastificante que tienen los FOS en la red polimérica. Los plastificantes interrumpen las interacciones a nivel inter e intramolecular dando lugar a la formación de interacciones FOS-proteína de suero, a costa de las interacciones polímero-polímero, dando como resultado un aumento de la separación de las cadenas y facilitando la movilidad molecular (Barreto et al., 2003). Como consecuencia, la red es menos frágil y a la vez menos resistente a la fuerza aplicada. Al llevar el porcentaje de FOS al 50% no se observaron diferencias significativas respecto a lo obtenido con 40% de FOS.

No se encontraron en la bibliografía films desarrollados con los mismos componentes por lo que no resulta posible realizar una comparación directa de resultados, sin embargo y a manera exploratoria se comparan a continuación con valores obtenidos de films desarrollados con otros agentes plastificantes y materiales lipídicos. Soininen et al (2013) informaron que la adición de miel de acacia y una mezcla binaria de fructosa y glucosa en películas de APS permitió obtener películas más fuertes que en aquellos casos en los que se usó glicerol como plastificante; informaron además, que la resistencia a la tracción de películas con miel de acacia fue ligeramente menor a la de la mezcla binaria de glucosa y fructosa. Estos autores encontraron también un aumento en el % de elongación cuando se aumentó la proporción de estas sustancias.

En películas de suero de leche a las que se adicionaron sustancias lipídicas, la respuesta fue muy diversa: el agregado de aceite de nuez aumentó significativamente la resistencia a la tracción de películas de suero de leche, obteniendo el efecto contrario cuando se adicionó aceite de almendras a las mismas películas, el efecto contrapuesto se justifica en esta investigación debido a la diferencia en la composición química de estos lípidos y su diferencia en la interacción entre la proteína y los lípidos, ya que el aceite de almendras tiene mayor proporción de ácidos linoléico y oléico (Galus y Kadzińska, 2016). Otros autores encontraron que al agregar sustancias liposolubles como la vitamina E el esfuerzo de tracción disminuyó conforme aumentaba la cantidad incorporada de vitamina E, siendo el valor máximo de esfuerzo de tracción para películas sin el agregado de vitamina E, igual a 4,55 MPa (Mei y Zhao, 2003). Estos valores fueron cercanos (entre 4,55 y 4,05 MPa) a los encontrados en este trabajo para las películas sin adición de FOS y superiores a los valores del esfuerzo de tracción correspondiente a los casos en los que se agregaron FOS. Estos mismos autores encontraron un mayor % de elongación a medida que se aumentaba la concentración de la vitamina. En los resultados de la **Tabla 2** se evidencia un aumento estadísticamente significativo del % de elongación cuando el contenido de FOS alcanza el 50%. Galus y Kadzińska (2016) reportaron resultados similares para películas de suero de leche con el agregado de aceite de almendras, mientras que con la adición de aceite de nuez en las mismas películas, los resultados fueron opuestos.

Un aumento en la concentración de FOS produjo una disminución significativa en el módulo elástico de las películas estudiadas, que representa una medida de la rigidez de la película (Pereda et al; 2012), es decir que a mayor concentración de FOS menor rigidez de la película para el rango de concentraciones estudiado. En películas de suero de leche añadida con aceite de almendras y nuez en un 0,5% se obtuvo un Módulo de Young mayor, siendo este módulo menor cuando se adicionaron ambas sustancias en un 1% a las películas estudiadas (Galus y Kadzinska, 2016).

CONCLUSIONES

Tanto el esfuerzo que resisten las películas antes de romperse como el módulo elástico disminuyen con el agregado de FOS hasta un 40% de concentración, lo que se atribuye al efecto plastificante de los FOS.

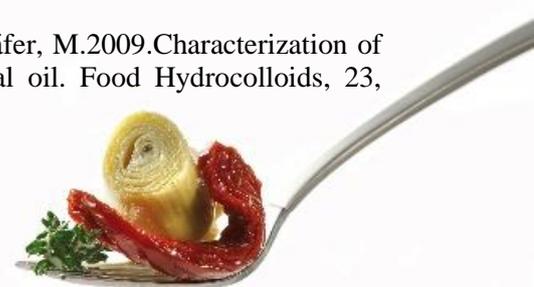
El porcentaje de elongación de las muestras aumenta significativamente cuando la concentración de FOS alcanza el 50% debido a la reducción en las interacciones intercatenarias ocasionadas por la presencia de los fructanos. El agregado de FOS aumenta la permeabilidad al vapor de agua dentro de todo el rango estudiado, sin embargo, los valores obtenidos son sensiblemente menores que el correspondiente a las películas de APS sin FOS.

De acuerdo a los resultados obtenidos la incorporación de un 40% de FOS en la formulación permitiría obtener una película de APS con adecuadas propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua, logrando además constituirse en un vehículo para el aporte nutricional de fructanos en la dieta.



BIBLIOGRAFÍA

- Barreto, P. L. M., Roeder, J., Crespo, J. S., Maciel, G. R., Terenzi, H., Pires, A. T. N., Soldi, V. 2003. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chemistry*, 82(3), 425-431.
- Bertuzzi, M. A., Castro Vidaurre, E. F., Armada, M., y Gottifredi, J. C., 2007. Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of food engineering*, 80(3), 972-978.
- Castro, R.A., González Blair, G.H. 2010. Evaluación fisicoquímica de la efectividad de un recubrimiento comestible en la conservación de uchuva (*Physalis peruviana* L.var. Colombia) *Revista de la asociación colombiana de ciencia y tecnología de alimentos*. *Alimentos Hoy* 19(21). ISSN 2027-291X.
- Coussement, P. 1999. Inulin y oligofructose: Safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition* 129: 1412S-1417S.
- Galus, S., Kadzińska, J. 2016. Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78-86
- Genta, S., Cabrera, W., Habib, N., Pons, J., Manrique Carillo, I., Grau, A. 2009. Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition*, 28:182-187.
- Gennadios, A., Brandenburg, A. H., Park, J. W., Weller, C. L., Testin, R. F. 1994. Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. *Industrial Crops and Products*, 2(3), 189-195.
- Han, J. H., Gennadios, A. 2005. Edible films and coatings: a review. *Innovations in food packaging*, 239, 262.
- Janjarasskul T., Rauch D. J., McCarthy K. L., Krochta J. M. 2014. Barrier and tensile properties of whey Protein candelilla wax film/sheet LWT. *Food Science and Technology* 56: 377-382
- Kadam, D. M., Thunga, M., Wang, S., Kessler, M. R., Grewell, D., Lamsal, B., Yu, C. 2013. Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 133-140.
- Khwalidia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., y Hardy, J. 2004. Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 239-251.
- Krochta, J. M. 1992. Control of mass transfer in foods with edible coatings and films. *Advances in food engineering*, 517-538.
- Krochta, J. M., De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenge and opportunities. *Food Technology*, 51, 61-74.
- Leuangasukrer, M., Phupoksakul, T., Tananuwong, K., Borompichaichartkul, C., Janjarasskul, T. 2014. Properties of konjac glucomannan-whey protein isolate blend films. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 94-100.
- Mei, Y., Zhao, Y. 2003. Barrier and mechanical properties of milk protein-based edible films containing nutraceuticals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(7), 1914-1918.
- Niness, K. Inulin and oligofructose. What are they? 1999. *J. Nutr*, 129, 1402-1406.
- Ojansivu, I., Ferreira, C. L., Salminen, S. 2011. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(1), 40-46.
- Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S.A., Cruz-Orea, A., Maté, J.I. 2009. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering* 92 (1), 56-62.
- Pereda, M., Amica, G., Marcovich, N. E. 2012. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1318-1325.
- Perez-Gago, M.B., Krochta, J.M. 2002. Formation and properties of whey protein films and castings. In: Gennadios, A. (Ed.), *Proteins-Based Films and Coatings*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 159-180.
- Ramos, Ó. L., Silva, S. I., Soares, J. C., Fernandes, J. C., Poças, M. F., Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2012. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, 45(1), 351-361.
- Rao, M. S., Kanatt, S. R., Chawla, S. P., Sharma, A. 2010. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate polymers*, 81, 1243-1247
- Roberfroid, M. B. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S 139-S143.
- Sanchez-Gonzalez, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. 2009. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109



Soininen, J. T., Heinämäki, J., Yliruusi, J. 2013. From acacia honey monosaccharide content to a new external binary plasticizer applicable in aqueous whey protein films. *Food and bioproducts processing*, 91(4), 440-446.

Vinderola G. 2008. Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry. *Trends in Food Science and Technology* 19: 40-46.

Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Huang, J., Kerry, J. F., and Kerry, J. P., 2008. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of whey protein isolate-based films using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(5), 787-796.

Zinoviadou, K. G., K. P. Koutsoumanis and C. G. Biliaderis. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 49-59. 2010.



Actividad antioxidante de films biodegradables a base de quitosano modificado con quercetina sobre la estabilidad oxidativa de zanahorias mínimamente procesadas

Gallo G.A.¹, Pellegrini A.¹, Baudi J.¹, Montenegro M.^{1,2}

¹ Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Nacional de Villa María. Campus Universitario, Arturo Jauretche 1555, Argentina.

² Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CIT VM-CONICET), Universidad Nacional de Villa María, Argentina.

gabigallo@yahoo.com.ar

RESUMEN

Actualmente el uso de recubrimientos comestibles es la técnica más novedosa y prometedora para alargar la vida útil de los productos mínimamente procesados (MP). Además, estos recubrimientos permiten el agregado de sustancias funcionales tales como antioxidantes. Debido a sus propiedades biodegradables, biocompatibles, antimicrobianas, antioxidantes y de formación de película, el quitosano (Ch) puede ser empleado como material de recubrimiento. La quercetina (Q), flavonoide ampliamente distribuido en la naturaleza y con gran capacidad antioxidante, puede ser incorporada en la formulación de recubrimientos biodegradables activos. El objetivo del trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante, frente radical anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$, y radical hidroxilo, $\cdot OH$, de films a base de quitosano nativo (Ch) y modificado con quercetina (Ch-Q), y el efecto del recubrimiento de zanahorias mínimamente procesadas con ambos films sobre el contenido de β -caroteno (BC) durante el almacenamiento refrigerado. Los resultados obtenidos mostraron que el film a base de Ch-Q presentó un porcentaje de desactivación (%D) de ambos radicales mayor que el de Ch. Se observó además, que la retención de BC fue mayor en las muestras recubiertas con Ch-Q y Ch, respecto de la muestra control sin recubrir, demostrando ser una alternativa viable para mejorar la calidad postcosecha de las zanahorias mínimamente procesadas.

Palabras clave: quitosano, recubrimiento bioactivo, antioxidante, zanahorias mínimamente procesadas

81

ABSTRACT

Currently, the use of edible coatings is the most innovative and promising technique to extend the shelf life of minimally processed (MP) products. Furthermore, these coatings allow the addition of functional substances such as antioxidants. Chitosan (Ch) is a promising biopolymer for use as packaging. It is biodegradable, biocompatible, has very good ability to form semipermeable films, has antimicrobial and antioxidant capacity. Quercetin (Q) is a known natural antioxidant that can be incorporated into the formulation of active biodegradable coatings (RB). The aim was to evaluate the antioxidant capacity, by scavenging superoxide anion radical, $O_2^{\bullet-}$, and hydroxyl radical, $\cdot OH$, of native chitosan (Ch) based film and modified with quercetin (Ch-Q) film, and the antioxidant capacity of minimally processed carrots coated with Ch and Ch-Q based film forming solution, during refrigerated storage. Results indicated that, for both radicals, Ch-Q based film showed a greater %D than Ch based film. In addition, the retention of BC was greater in Ch-Q based and Ch based coating samples than control one, proving a suitable alternative for application to MP carrots improving postharvest quality.

Keywords: chitosan, bioactive film, antioxidant, minimally processed carrot

INTRODUCCIÓN

Las tecnologías actuales de envasado tienen por objeto preservar la frescura y la integridad de los alimentos al tiempo que proporcionan a las empresas una forma barata y eficiente para envasar sus productos (Chin 2010). Aunque este método es efectivo, la creciente preocupación por el medio ambiente y las exigencias cada vez mayores de reducir el impacto en la contaminación ambiental ocasionada por el uso de envases no biodegradables, ha aumentado el interés por el desarrollo de películas y recubrimientos biodegradables que mantengan la seguridad, funcionalidad y resistencia mecánica al igual que los envases de materiales sintéticos (García 2008).



El Ch, biopolímero natural derivado de la quitina resulta muy interesante para la industria alimenticia gracias a una combinación inusual de actividades biológicas y propiedades tanto mecánicas como físicas (Mourya et al. 2008). También ha sido considerado como una materia prima potencial para su uso como material de envasado activo biodegradable (Siripatrawan et al. 2010).

Diversos estudios han demostrado que los films a base de Ch tienen un alto potencial para incrementar la vida útil de frutas frescas y vegetales, inhibiendo el crecimiento de microorganismos, reduciendo la producción de etileno, incrementando el gas carbónico interno y disminuyendo los niveles de O₂ (Aranaz 2009).

La incorporación de antioxidantes en los materiales de envasado es cada vez más común ya que la oxidación es el mayor problema que afecta la calidad de los alimentos. A pesar de que los antioxidantes sintéticos son muy efectivos por su alta estabilidad y eficiencia, hay diferentes cuestiones relacionadas con aspectos toxicológicos y el potencial riesgo para la salud. Numerosas investigaciones se han desarrollado con el fin de emplear antioxidantes naturales como alternativa a los sintéticos. El Ch también presenta capacidad antioxidante que ha sido previamente documentada. La actividad secuestrante de radicales libres que presenta el Ch se ha atribuido a la presencia de los grupos nitrogenados protonados sobre el C-2, que tienen la capacidad de unirse simultáneamente con varios radicales libres (Park et al. 2004).

La Q es uno de los antioxidantes más potentes entre los polifenoles (Formica y Regelson 1995, Rice-Evans et al. 1997, Prior 2003), estando sus efectos antioxidantes estrechamente vinculados con la potencial generación de intermediarios reactivos pro-oxidantes que resultan mutágenos y genotóxicos (Boots et al. 2003).

La modificación enzimática del Ch consiste en emplear una enzima para generar un reactivo intermediario que luego reaccione con el polímero. Los grupos reactivos que presenta el Ch pueden ser modificados permitiendo su funcionalización con gran variedad de moléculas bioactivas. Mediante la formación de bases de Schiff o aducto de Michael se produce el acoplamiento de la quinona de los flavonoides a los polímeros que contienen grupos NH₂ (Brzonova et al. 2011; Jayakumar et al. 2005).

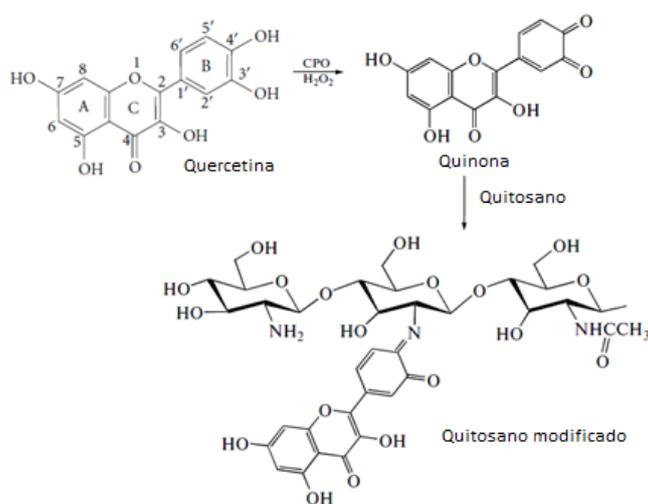


Figura 1. Mecanismo de reacción de Ch con Q (Torres et al. 2012)

Este proceso de acoplamiento está siendo cada vez más estudiado con el objetivo de lograr diferentes aplicaciones en la industria alimentaria (Kudanga et al. 2011). Torres et al. (2012) evaluaron la capacidad oxidativa de la CPO sobre diversos flavonoides, incluido la Q, produciendo compuestos intermediarios que reaccionaron con el Ch.

En este contexto, se establece como objetivo del trabajo, evaluar la capacidad antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno (O₂^{•-} y [•]OH), de films a base de Ch y Ch-Q, y el efecto de los mismos sobre la estabilidad oxidativa de zanahorias mínimamente procesadas, determinando el contenido de BC durante el almacenamiento refrigerado de las mismas.



MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Para la formación de los films se empleó Ch de bajo peso molecular, quercetina (Q) y enzima Cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomycesfumago*, obtenidos de Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante técnica HPLC de vegetales recubiertos se utilizaron los patrones β -caroteno (tipo II, sintético, $\geq 95\%$ HPLC, cristalino) provistos por Sigma-Aldrich (USA).

Derivatización del Ch

Se realizó la oxidación enzimática de la Q. La reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía 20% de isopropanol y 80 % de buffer fosfato (0,1 M, pH 5,5), 5×10^{-5} M de Q, 100 nM de CPO, 50 μ M de H_2O_2 y 0,537 M de KCl. Se trabajó a una temperatura de 25°C y bajo continua agitación. La enzima utilizada presentó una actividad de 14400 U/ml para la cloración de la monoclorodimedona (MCD). El avance de la reacción fue monitoreado a través del consumo de absorbancia en el rango de 200 – 600 nm, y la formación de una nueva banda de absorción a 300 nm. La conversión enzimática se llevó a cabo por triplicado. Las medidas de absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos SPECORD S600 marca Analytik Jena.

Una vez determinado el tiempo óptimo de oxidación de la Q, se adicionó 0,8% p/v de Ch nativo, previa acidificación de la mezcla con ácido acético. Luego de 12 h de agitación, se elevó el pH de la mezcla con la adición de NaOH 1M hasta obtener el precipitado de Ch modificado. Posteriormente, se lavó el sólido obtenido con isopropanol al 50% v/v en agua a fin de remover la Q oxidada sin reaccionar. Finalmente, el Ch modificado se secó en estufa de vacío (Arcano, Modelo DZF 6020) a 40°C, hasta peso constante.

Obtención del film biodegradable a base de Ch nativo y Ch derivatizado

Se utilizó la misma metodología para la obtención de ambos films, de Ch y Ch-Q, según el método propuesto por Bourbon et al. (2011) con algunas modificaciones. Se disolvió 1% p/v de Ch y Ch-Q en solución de ácido láctico al 1% p/v. Se dejó agitar, usando agitador magnético durante 5 h, a temperatura ambiente. Se centrifugó la solución durante 10 min a 5000 x g; se utilizó una ultracentrífuga Thermo Fisher Scientific, Modelo Sorvall ST16R. A la solución resultante, se le adicionó glicerol al 1% p/v como plastificante y Tween 80 al 0,2% p/v como surfactante. A fin de obtener una película de espesor lo más uniforme posible, se tomó un volumen constante (20 ml) de la solución formadora de film y se colocó en placas de Petri de 90mm de diámetro. Luego se secaron en estufa (San Jor, Modelo Serie SL DB,) a 35°C durante 40 h. Las propiedades antioxidantes se evaluaron inmediatamente después de que los recubrimientos fueron removidos de las placas.

Desactivación de $O_2^{\bullet-}$

Se determinó por el método basado en la autooxidación de hidroxilamina en presencia de Azul de Nitrotetrazolium (NBT²⁺) que es reducido a monoformazan (MF⁺) (SabuyKuttan 2002). El MF⁺ tiene un máximo de absorción a 560 nm. Se determinaron los porcentajes de desactivación (% D) a partir de las absorbancias en ausencia y presencia de Ch y Ch-Q.

El medio de reacción fue provisto por buffer fosfato 50 mM pH 8 (500 μ l), se añadieron NBT 1 mM (300 μ l), EDTA 1 mM (100 μ l), clorhidrato de hidroxilamina 5 mM (500 μ l), completando con la solución de antioxidante (Ch y Ch-Q) y/o agua hasta volumen final de 3 ml. Se evaluaron concentraciones del antioxidante de 0,11 mg/ml, 0,22 mg/ml y 0,44 mg/ml. Luego de un período de incubación de 1 h a 37°C, se leyeron las respectivas absorbancias a 560 nm. Las medidas de absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos. El % D de ($O_2^{\bullet-}$) fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% D = 100 \frac{(A_0 - A_x)}{A_0} (1)$$

Donde A_0 es el valor de absorbancia obtenida para la solución control, sin antioxidante, y A_x es el valor de absorbancia en presencia de estos compuestos.

Desactivación de $\cdot OH$: Método de la desoxirribosa

Se basa en la determinación de la capacidad de un antioxidante para inhibir la formación de malonaldehído (MAD) producido por oxidación de 2-Desoxi-D-ribosa por $\cdot OH$ generado a partir de la reacción de Fenton a pH 7,4. El MAD en presencia de TBA forma un aducto ($\lambda_{\text{máx}}$: 532 nm) cuya inhibición se traduce a comportamiento antioxidante de Ch o Ch-Q.



El medio de reacción fue provisto por buffer fosfato 50 mM pH 7,4 (400 μ l), se añadieron 2-Desoxi-D-ribosa 10 mM (560 μ l), peróxido de hidrógeno 100 mM (50 μ l), cloruro férrico 1 mM (50 μ l), EDTA 5 mM (50 μ l), ácido ascórbico 5 mM (40 μ l), completando con la solución de antioxidante (Ch o Ch-Q) y/o agua hasta volumen final de 2 ml. Se evaluaron iguales concentraciones que para la desactivación del radical $O_2^{\bullet-}$. Luego de 1 h a 37°C, se adicionó TBA 1 % p/v (1 ml) y TCA 5,6 % p/v (1 ml), y se mantuvieron las muestras a 95°C durante 20 min, para posteriormente leer las respectivas absorbancias. Las medidas de absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis. El % de desactivación (% D) de \bullet OH fue calculado de acuerdo a la ecuación 1.

Determinación del contenido de β -caroteno

La determinación se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El equipo utilizado (ThermoScientificUltimate 3000) cuenta con una bomba cuaternaria, detector UV/Vis, detector de arreglo de diodos y un inyector de 10 μ l, y la adquisición y procesamiento de datos se realizó por Software Chromeleon. Para todas las muestras, incluido los patrones, se utilizó una columna C18 LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m). Las curvas de calibración fueron obtenidas al graficar en software OriginPro8 de OriginLabCorporation, el área del pico versus la concentración de la solución estándar empleada. A partir de estas curvas se cuantificó el contenido de BC de las muestras. La concentración se expresó en μ g/g.

Las zanahorias fueron seleccionadas según su forma, tamaño y aspecto, se lavaron con agua potable durante 1 min, se descartaron los extremos, se pelaron y se cortaron en rodajas de 5 mm de espesor. Se trabajó con 3 unidades experimentales de rodajas de zanahorias: SR = control (sin recubrir); Ch = recubiertas con solución formadora de film a base de Ch; Ch-Q = recubiertas con solución formadora de film a base de Ch-Q. El recubrimiento se realizó por inmersión, durante un 1 min, en cada una de las soluciones. Luego, se coloraron en bandejas y se almacenaron bajo refrigeración a 4°C y 60% \pm 5% de HR durante 10 días. Se realizó la determinación del BC a 4 tiempos diferentes: 0, 3, 7 y 10 días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para realizar el análisis y cuantificación del BC, se procedió según metodología descrita por Assunção y Mercadante (2003), con algunas modificaciones. Se utilizó como fase móvil 90% MeOH:10% Acetonitrilo. Previo a su inyección, se redisolvieron los extractos secos de las muestras en 3 ml de MeOH grado HPLC y se sonicaron por 20 min. Se filtraron las muestras por membranas MILLIPORE HV (Durapore) en PVDF, 0,45 μ m de poro, 13 mm de diámetro, y se inyectaron inmediatamente luego de ser redisoluidos. Las concentraciones del patrón de β -caroteno se determinaron por espectroscopia UV-Vis y se cubrió el rango de 60 a 120 μ g/g.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados fueron analizados estadísticamente, empleando el software StatgraphicsCenturion XV en su versión 15.2.05., mediante análisis de la varianza ANOVA multifactorial, con el objetivo de comparar si los factores tratamientos y repeticiones, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de β -caroteno. También se realizó la prueba de Rangos Múltiples (LSD) y Prueba de Hipótesis, con un nivel de significancia del 95,0%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades antioxidantes de los recubrimientos

En las condiciones del ensayo, ambos films se solubilizaron totalmente, obteniéndose una concentración de 0,38 mg/ml de Ch y Ch-Q en solución. En la **tabla 1** se expresa el %D de las EROS $O_2^{\bullet-}$ y \bullet OH en función de la concentración de Ch y Ch-Q solubilizado, y las diferencias de desactivación encontradas entre las fracciones solubles.

Tabla 1. Porcentaje de desactivación (% D) frente a radical $O_2^{\bullet-}$ y \bullet OH de la fracción soluble (0,38 mg/ml) de las películas de Ch y Ch-Q

Film	% D $O_2^{\bullet-}$	% D \bullet OH
Ch	40,19	67,30
Ch-Q	52,60	73,97
Diferencia (%)	12,41	6,67



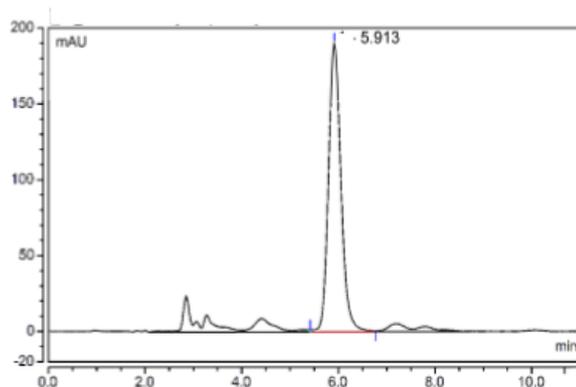
Los resultados obtenidos demuestran que los films a base de Ch-Q presentaron un mayor efecto antioxidante frente a ambas especies radicalarias respecto de la fracción soluble del film a base de Ch. Considerando ambas especies radicalarias, fue posible observar que la diferencia positiva en el %D de $O_2^{\bullet-}$ que presentó el film de Ch-Q fue aproximadamente el doble que la mostrada para el $\bullet OH$, respecto del film a base de Ch; esto resultó favorable ya que, comparado con otros, el $O_2^{\bullet-}$ es uno de los radicales más tóxicos, presenta un tiempo de vida mayor y, por lo tanto, resulta ser más peligroso (Vinšová y Vavříková 2012). Presentando el film de Ch-Q el mayor poder antioxidante frente al radical $\bullet OH$.

Fras-Zemljic et al. (2011) evaluaron la capacidad antioxidante de fibras de Ch derivatizado con Q modificada enzimáticamente, frente al $O_2^{\bullet-}$ y demostraron que hubo un aumento en la actividad antioxidante de las muestras analizadas. La Q posee un grupo OH dentro de su estructura que no es afectado por la enzima y hace que resulte un antioxidante más efectivo. La capacidad antioxidante del flavonoide, no sólo está relacionada con el número de grupos OH presentes en la molécula, sino también con la habilidad de éstos para ceder átomos de H (Lemanska et al. 2001), siendo éste, uno de los mecanismos principales para impedir o ralentizar las reacciones en cadena de los radicales (Rong et al. 2012). La presencia de Q en la molécula de Ch podría aumentar el grado de desprotonación de la molécula e incrementar la actividad antioxidante de la fracción soluble del film. La Q pura tiene dos grupos OH en las posiciones 5 y 7 del anillo A. El grupo en la posición 7 es más ácido ya que tiene un valor de pKa de 7,5, mientras que el otro grupo en la posición 5 tiene un valor de pKa de 9,4. Fras-Zemljic et al. (2011) demostraron que estos valores cambian cuando la Q se encuentra en estado oxidado, presentando un pKa de 5,8 y 9,8, respectivamente. Los cambios en los valores de pKa pueden ocurrir como consecuencia de varios factores. Las interacciones electrostáticas entre los grupos OH cargados negativamente de los flavonoides y los grupos NH_3^+ cargados positivamente del Ch llevan a la estabilización de los OH desprotonados, y por lo tanto tienden a bajar los valores de sus pKa. Por otra parte, si el grupo OH se encuentra en un ambiente hidratado, que puede ocurrir en este caso como consecuencia de una mayor solubilidad, tiende a facilitar la cesión de H^+ y disminuir el pKa. Ha sido demostrado que la desprotonación del OH tiene una gran influencia sobre el potencial antioxidante intrínseco del flavonoide, el aumento del grado de desprotonación generalmente mejora la acción antioxidante del flavonoide (Van Acker et al. 1996).

Determinación del contenido de β -caroteno

Los resultados obtenidos (**Figura 2**) revelan que las muestras a tiempo = 0 d presentan un contenido de 82,5 mg/100 g de producto fresco.

Figura 2. Cromatograma de muestra de zanahoria a tiempo 0d.



Según los resultados obtenidos, el contenido de BC de las muestras de zanahorias mínimamente procesadas SR, Ch y Ch-Q disminuyó considerablemente luego de 10 días de almacenamiento a 4°C (**Figura 3**). Sin embargo, la retención de BC fue mayor en las muestras recubiertas con Ch-Q respecto de la muestra SR. A los 10 días, el contenido de BC fue de 66,7 mg/100 g (retención del 80,81%) y 59,5 mg/100 g (retención del 72,13%) para Ch-Q y Ch, respectivamente, comparado con 43,5 mg/100 g (retención 52,75%) para SR (**Tabla 2**).



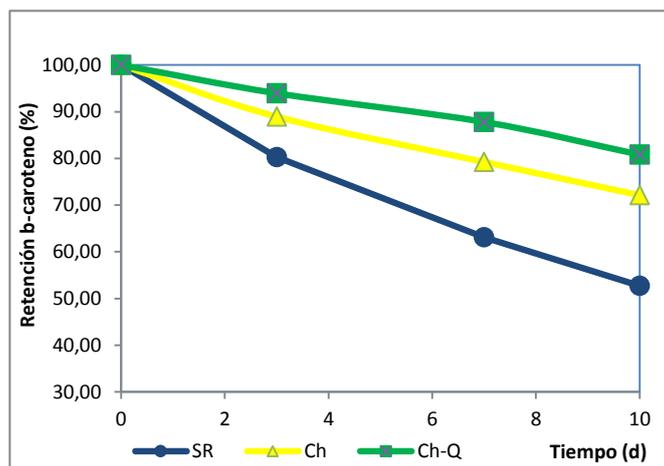


Figura 3. Porcentaje de retención de BC de zanahorias mínimamente procesadas almacenadas bajo refrigeración durante 10 días, SR (línea azul), Ch (línea amarilla), Ch-Q (línea verde).

Tabla 2. Contenido de BC (mg/100g) de las muestras SR, Ch y Ch-Q a los tiempos 0, 3, 7 y 10 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo (d)	Contenido β -caroteno (mg/100g)		
	SR	Ch	Ch-Q
0	82,5	82,5	82,5
3	66,2	73,4	77,5
7	52,1	65,4	72,5
10	43,5	59,5	66,7

Analizando estadísticamente los resultados obtenidos según un ANOVA general multifactorial, se obtiene que el recubrimiento aplicado sobre las muestras (factor Tratamiento) y tiempo de almacenamiento (factor Tiempo) tuvieron un efecto estadísticamente significativo (con un valor-P menor que 0,05) sobre el contenido de BC con un 95% de confianza; no teniendo el factor Repeticiones influencia sobre la variable. Al realizar un análisis estadístico a cada tiempo evaluado, se puede observar que los resultados del ANOVA, presentados en la **tabla 3**, demuestran que, durante todo el tiempo de almacenamiento, el recubrimiento aplicado sobre las muestras (factor Tratamiento) tuvo un efecto estadísticamente significativo (con un valor-P menor que 0,05) sobre el contenido de BC con un 95% de confianza; no teniendo el factor Repeticiones influencia sobre la variable.

86

Tabla 3. Análisis de Varianza para BC a los tiempos 3, 7 y 10 días de almacenamiento bajo refrigeración de las muestras SR, Ch, Ch-Q

Tiempo (d)	Valor-P	
	Tratamientos	Repeticiones
3	< 0,05	0,5864
7	< 0,05	0,1606
10	< 0,05	0,2027

Mediante el test LSD (**tabla 4**), se puede observar que a todos los tiempos evaluados, existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres muestras, SR, Ch y Ch-Q. Resultando ser el tratamiento Ch-Q el más efectivo durante todo el tiempo de almacenamiento bajo refrigeración.



Tabla 4. Test LSD para contenido de BC (mg/100g) por Tratamiento aplicado a las muestras a los 3 tiempos evaluados. Se presentan los valores medios del contenido de BC y el valor de desviación estándar. Letras iguales no representan diferencias significativas

Tratamientos	Tiempo (d)		
	3	7	10
SR	66,23 ± 0,11	52,10 ± 0,36	43,53 ± 0,35
Ch	73,40 ± 0,10	65,40 ± 0,20	59,53 ± 0,11
Ch-Q	77,53 ± 0,47	72,46 ± 0,37	66,72 ± 0,34

Mediante la Prueba de Hipótesis se confirman los resultados encontrados en el ANOVA y el LSD. Se plantea como Hipótesis Nula (H_0) que no hay diferencias entre las medias y como Hipótesis Alternativa (H_1) que sí existen diferencias entre medias. Como se muestra en la **tabla 5**, cuando el Valor-P es menor que 0,05, puede rechazarse la H_0 con un 95,0% de nivel de confianza, es decir, en todos los casos sí se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados.

Tabla 5. Test de Hipótesis para BC. Hipótesis Nula: diferencia entre medias = 0,0. Hipótesis Alternativa: diferencia entre medias \neq 0,0

Contraste	Valor-P		
	Tiempo (d)		
	3	7	10
Ch - Ch-Q	1,2067 x10 ⁻⁴	8,9124 x10 ⁻⁶	4,4669 x10 ⁻⁶
Ch - SR	1,3745 x10 ⁻⁷	6,1442 x10 ⁻⁷	1,8977 x10 ⁻⁷
Ch-Q - SR	2,2807 x10 ⁻⁶	2,8905 x10 ⁻⁷	1,3690 x10 ⁻⁷

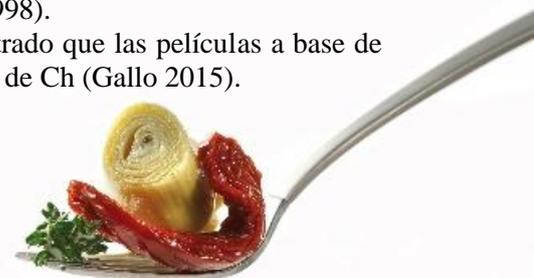
Resultados similares fueron encontrados por Li y Barth (1998), donde evaluaron el contenido de BC sobre muestras de zanahorias mínimamente procesadas recubiertas con films a base de celulosa, envasadas y almacenadas bajo refrigeración. Luego de 28 días de almacenamiento se obtuvo una retención de un 15% mayor para las muestras recubiertas en comparación con la muestra control sin recubrir.

Las posibles razones de las pérdidas de caroteno en las zanahorias durante el almacenamiento son la autooxidación, que se produce espontáneamente cuando se combina O_2 del aire con los carotenos, y la oxidación enzimática, la cual es catalizada por enzimas oxidativas (Gross1991). La estructura celular que protege a los carotenoides en la naturaleza limita su biodisponibilidad. Sin embargo, varios estudios han demostrado que el procesamiento puede aumentar la biodisponibilidad de los carotenoides (Stahl et al. 1992, Van hetHofet al. 2000). La oxidación enzimática puede ocurrir antes de un tratamiento térmico, durante el pelado, troceado, trituración o fabricación de jugo o pulpa, con lo cual los alimentos mínimamente procesados son susceptibles de ser alterados (Azevedo-Meleiroet al. 2005a, b). La degradación oxidativa no enzimática se sabe que aumenta con la destrucción de la estructura celular del alimento, a mayor área superficial o porosidad, longitud y severidad de las condiciones de procesamiento, a mayor tiempo y temperatura de almacenamiento, así como con el uso de los envases permeables al oxígeno y la luz (Rodríguez-Amaya et al. 2006).

La abrasión de la superficie de la zanahoria que se produce en la etapa de pelado, expone al floema, donde hay mayor concentración de carotenos, al aire y a la luz, facilitando así la liberación de los carotenoides desde la matriz del alimento (Li y Barth 1998).

Los recubrimientos comestibles sirven como una capa protectora y controlan la permeabilidad al O_2 y CO_2 , disminuyendo así la autooxidación de los carotenos (Li y Barth1998). Diversos tratamientos con recubrimientos comestibles sobre vegetales producen un retardo en la respiración y el metabolismo (Nisperos-CarriedoyBaldwin1988, Bender et al. 1993), indicando que la actividad de las enzimas implicadas en la oxidación de carotenos puede ser suprimida o bien, el sustrato (O_2) está limitado por la aplicación de estos recubrimientos. Esto puede conducir a la disminución de pérdidas de caroteno en las zanahorias recubiertas durante el almacenamiento frente a las muestras SR (Li y Barth1998).

Según estudios realizados previamente (datos no presentados), se ha demostrado que las películas a base de Ch-Q presentaron una menor transparencia y permeabilidad al O_2 que el film de Ch (Gallo 2015).



CONCLUSIONES

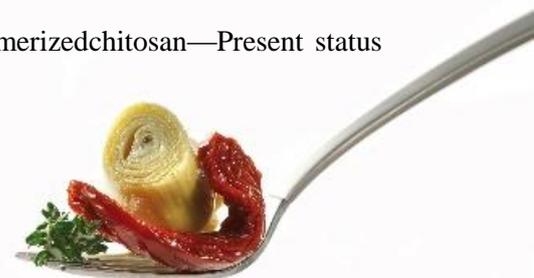
Las películas a base de Ch modificado, presentaron una mayor capacidad antioxidante frente a los radicales $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot OH$ que las obtenidas a base de Ch nativo. Además, presentaron una diferencia positiva en el %D de $O_2^{\cdot-}$ que es aproximadamente el doble que la mostrada para el $\cdot OH$, respecto del film a base de Ch. Presentando el mayor poder antioxidante frente al radical $\cdot OH$, y resultando más adecuadas para la aplicación en recubrimiento de vegetales procurando la estabilidad oxidativa de los mismos.

Se obtuvo una disminución de la pérdida de BC durante el almacenamiento bajo refrigeración por la limitada disponibilidad de O_2 debido a la reducción de la permeabilidad al O_2 y la mayor capacidad antioxidante mostrada por los films; y por su efecto fotoprotector relacionado a la menor transparencia de los mismos en la región visible.

Los films a base de Ch-Q presentan un alto potencial para ser utilizados como material de embalaje complementario a los materiales sintéticos para recubrir zanahorias mínimamente procesadas, en combinación con otros tipos de control, como ser, la calidad de la materia prima, condiciones adecuadas de procesamiento y temperaturas óptimas de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3: 203-230.
- Assunção, R. B., Mercadante, A. Z. 2003. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale L.*): variety and geographic effects. *Food Chemistry*, 81: 495-502.
- Azevedo-Meleiro, CH., Rodriguez-Amaya, D.B. 2005a. Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *J Sci Food Agric*, 85: 591-597.
- Azevedo-Meleiro, CH., Rodriguez-Amaya, D.B. 2005b. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *J Food Comp Anal*, 18: 845-855.
- Bender, R.J., Brecht, J.K., Sargent, S.A., Navarro, J.C., Campbell, C.A. 1993. Ripening initiation and storage performance of avocados treated with an edible-film coating. *Acta Horticulturae*, 343: 184-186.
- Boots, A.W., Kubben, N., Haenen, G.R., Bast, A. 2003. Oxidized Quercetin Reacts with Thiols Rather than with Ascorbate: Implication for Quercetin Supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 308: 560-565.
- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M.R., Avides, M. C., Quintas, M. A.C., Vicente, A. A. 2011. Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, 106: 111-118.
- Brzonova, I., Steiner, W., Zankel, A., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G.M. 2011. Enzymatic synthesis of catechol and hydroxyl-carboxylic acid functionalized chitosan microspheres for iron overload therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79: 294-303.
- Chin, A.W. 2010. *Polymers for Innovative Food Packaging*. An Interactive Qualifying Project Report. Faculty of Worcester Polytechnic Institute.
- Vinšová J, Vavříková E. 2012. Antioxidant Polymers by Chitosan Modification. En: Cirillo, G., Iemma, F. editores. *Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications*. Scrivener Publishing. pag. 115-131
- Formica J.F., Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Tox*, 33: 1061-1080.
- Fras-Zemljic, L., Kokol, V., Cakara, D. 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan-based viscose fibres enzymatically functionalized with flavonoids. *Text. Res. J.*, 81: 1532-1540.
- Gallo G. 2015. Estudio de propiedades fisicoquímicas y biológicas de películas bioactivas a base de quitosano y su efecto sobre la extensión de la vida útil de vegetales mínimamente procesados. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- García, M.A. 2008. Películas y cubiertas de quitosano en la conservación de vegetales. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18: 71-76.
- Gross, J. 1991. Carotenoids. En Gross, J. autor. *Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids*. 1ª ed. New York: Avi Books, Van Nostrand Reinhold Company Inc, pag. 92-97.
- Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Reis, R.L., Mano, J.F. 2005. Graft copolymerized chitosan—Present status and applications. *Carbohydrate Polymers*, 62: 142-158.



- Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., Burton, S. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 48: 195–208.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E. M. F. y Rietjens, I. M. C. M. 2001. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*, 31: 869–881.
- Li, P., Barth, M.M. 1998. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly processed carrots. *Postharvest Biology and Technology*, 14: 51–60.
- Mourya, V.K., Inamdar, N.N. 2008. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, 68: 1013–1051.
- Nisperos-Carriedo, M.O., Baldwin, E.A. 1988. Effect of two types of edible films on tomato fruit ripening. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 101: 217–220.
- Park, P.J.; Je, J.Y., Kim, S.K. 2004. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymers*, 55: 17–22.
- Prior R.L. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 570–578.
- Rice-Evans C.A., Miller J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Science*, 2: 152–159.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Rodriguez, E. B., Amaya-Farfan, J. 2006. Advances in Food Carotenoid Research: Chemical and Technological Aspects, Implications in Human Health. *Malaysian Journal of Nutrition*, 12: 101–121.
- Rong, Y., Wang, Z., Wu, J., Zhao, B. 2012. A theoretical study on cellular antioxidant activity of selected flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 93: 235–239.
- Sabu, M.C., Kuttan, R. 2002. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 155–160.
- Siripatrawan, U., Harte, B.R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24: 770–775.
- Stahl, W., Sies, H. 1992. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat processed than from unprocessed tomato juice in humans. *Journal of Nutrition*, 122: 2161–2166.
- Torres, E., Marín, V., Aburto, J., Beltrán, H. I., Shirai, K., Villanueva, S., Sandoval, G. 2012. Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48: 151–158.
- Van Acker, S. A. B. E., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgh, W. J. F., Bast, A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 331–342.
- Van het Hof KH, de Boer BCJ, Tijburg LBM, Lucius BRHM, Zijp I, West CE, Hautvast JGAJ., Weststrate, J.A. 2000. Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *Journal of Nutrition*, 130: 1189–1196.



Aplicación de recubrimientos comestibles a rodajas de banana deshidratadas

Gamboni J¹, Slavutsky, A¹⁻², Lopéz E³, Bravo, J², Bertuzzi A¹⁻²

¹ INQUI-CONICET, Av. Bolivia 5150, Salta, Argentina.

² Facultad de Ingeniería-Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, Salta, Argentina.

³ CIT-JUJUY. CONICET, Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.

RESUMEN

Se obtuvieron chips de banana deshidratadas por secado convectivo con aire forzado. Se emplearon bananas en un estado de madurez de 6-7 con un contenido de azúcar de alrededor del 17%. Se obtuvieron rodajas de banana de 30 mm x 3 mm de espesor. Se realizó un pretratamiento de deshidratación por ósmosis en solución de sacarosa y ácido cítrico y se analizó el efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible de almidón sobre las rodajas de banana pretratadas. Posteriormente se realizó el secado de las muestras por convección con aire forzado a 60°C durante 20 horas. Se compararon rodajas de banana sin tratamiento previo (control), rodajas de banana con pretratamiento de osmosis inversa (OI) y rodajas de banana con pretratamiento de osmosis inversa y recubrimiento (OIR). Se estudió la estabilidad del producto y las propiedades organolépticas. Se obtuvieron las isotermas de sorción de agua del producto deshidratado y se llevó a cabo el análisis sensorial a fin analizar los efectos de los procesos empleados sobre la aceptabilidad del producto y su conservación. Las muestras OIR presentan menor contenido de humedad final. Tanto la osmosis inversa, como el recubrimiento, conservan las características sensoriales del alimento seco obtenido, aún tras el almacenamiento.

Palabras clave: banana, secado, ósmosis inversa, recubrimiento comestible.

ABSTRACT

Dehydrated banana chips were obtained by forced air convective drying. Bananas in a ripeness state of 6-7 with a sugar content of about 17% were selected. Bananas were sliced to 30 mm in diameter and 3 mm thickness. A pre-treatment of reverse osmosis dehydration was performed using a sucrose solution with citric acid. The effect of the application of an edible starch coating on pre-treated banana slices was analysed. Subsequently the samples were dried by forced air convection at 60°C during 20 hours. Banana slices without pre-treatment (control), banana slices pre-treated by reverse osmosis (OI) and banana slices pre-treated with reverse osmosis and coated (OIR) were compared. Product stability and organoleptic properties were studied. Water sorption isotherms of dried product were obtained. Sensory analysis was carried out to determine the effects of the processes used on product acceptability and its conservation. OIR samples show lower final moisture content. Both, reverse osmosis as well as coating, retain the sensory characteristics of dried food, even after storage.

Keywords: banana, drying, reverse osmosis, edible coatings.

INTRODUCCIÓN

La cocción de alimentos se utiliza en gran medida para estabilizar el producto mediante la reducción de su contenido de humedad, modificación de la textura y del sabor de los mismos. Es importante mencionar que el secado y la cocción, no se consideran procesos semejantes, ya que la cocción, es solo una parte de la preparación del producto, debido a que la misma puede incluir otros procedimientos como la incorporación de ingredientes para mejorar su sabor o textura. Actualmente, es muy común el consumo de chips de banana como snack o utilizados como ingrediente en cereales para el desayuno. Para producir estos chips se emplea el método de cocción por fritura. El método consiste en cocinar el alimento en aceites vegetales o grasas, que gracias a su elevado punto de ebullición (mucho más elevado que el del agua) es capaz de eliminar el agua del producto a una elevada velocidad. La desventaja de este método es que una parte del material lipídico empleado en la cocción se integra al alimento, modificando el flavor y la calidad nutricional del mismo sobre todo, cuando se emplea en frutas y verduras. Por otra parte, la deshidratación es un procedimiento empleado en la conservación que consiste en la eliminación del agua del alimento hasta obtener un producto con la



humedad final deseada. Los principales objetivos de la deshidratación son incrementar la vida útil del producto, reducir los costos de envasado y almacenamiento, mejorar las cualidades sensoriales, retener el aroma y en algunos casos, la preservación del valor nutricional del mismo. Los métodos de deshidratación se pueden clasificar en secado térmico, deshidratación osmótica y desaguado mecánico y/o una combinación de los mismos. La deshidratación osmótica es una técnica que permite eliminar parcialmente el agua de los tejidos de los alimentos por inmersión en una solución hipertónica, sin dañar el alimento ni afectar desfavorablemente su calidad. El contenido de humedad que se consigue no es tan bajo como para que el producto acabado pueda ser considerado comercialmente estable. Por lo tanto, un producto deshidratado osmóticamente, normalmente debe ser sometido a algún otro procedimiento adicional (métodos de secado por aire, congelación o vacío). Puede considerarse un pretratamiento, que posee las ventajas de mejorar la calidad del alimento, aumentar la eficiencia energética y aumentar la estabilidad del producto y la retención de nutrientes durante el almacenamiento. El secado es el método más sencillo, en general se realiza dentro de una cámara cerrada y a una temperatura controlada, por la que circula aire caliente sobre el producto colocado en bandejas abiertas. El secado se produce por convección, mediante un proceso generalmente continuo y se emplea en productos cuyo valor es relativamente bajo. El secado es uno de los procesos de la industria que mayor consumo de energía requiere por lo cual, la combinación de este método con la deshidratación osmótica, reduce los costos energéticos, tiempos y temperaturas de trabajo, conduciendo a mejorar calidad del producto obtenido.

Los recubrimientos comestibles se elaboran a partir de materiales comestibles que forman una capa fina sobre el alimento y se caracterizan por constituir una barrera semipermeable a los gases y al vapor de agua, retrasar el deterioro del alimento, mejorar las propiedades mecánicas, ayudar a mantener la integridad estructural del producto que envuelven, retener compuestos volátiles e incluso actuar como vehículo de aditivos alimentarios. Aplicados en frutas y verduras, permiten generar atmósferas modificadas, reduciendo su velocidad de deterioro.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso de recubrimientos de almidón sobre rodajas de banana deshidratadas. En este trabajo se analizó el efecto de la aplicación del recubrimiento comestible sobre rodajas de banana deshidratadas por osmosis y posterior secado de las mismas por convección con aire forzado y se estudió la estabilidad del producto y las propiedades organolépticas. Se realizó una caracterización inicial de la fruta fresca, se obtuvieron las isotermas de sorción de agua del producto deshidratado y se llevó a cabo un análisis sensorial, a fin analizar el efecto de los procesos empleados sobre las características finales del producto y su estabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización inicial de la fruta

La fruta fresca fue obtenida en el mercado local. Se emplearon bananas en un estado de madurez 6-7 correspondiente a la fruta con un contenido de azúcar de alrededor del 17.5% y con una coloración amarilla uniforme. Ensayos previos permitieron determinar que el contenido de azúcar debe ser lo suficientemente alto como para asegurar el sabor y consistencia adecuados pero por otro lado, si la fruta está demasiado madura, la banana resulta pegajosa y toma color oscuro durante el proceso.

Determinación de sólidos solubles totales (SST)

Se realizó mediante refractometría (Hand Held Refractometer, ZGRB-32ATC). Se licuaron 30 g de fruta en 90 ml de agua destilada. Se colocó una gota de mezcla en el prisma del refractómetro y se registró el valor observado. La determinación se realizó por triplicado a 20°C. El valor resultante se multiplicó por la dilución y se expresó en °Brix.

Determinación de pH y acidez titulable

El valor de pH de las muestras de pulpa se determinó utilizando un electrodo de pH (Arcano, PHS-3E). La acidez titulable de las muestras de pulpa se determinó mediante un análisis volumétrico con hidróxido de sodio 0.1 N hasta un pH final de 8.1. El porcentaje de ácido presente se expresó en función de ácido málico. Las determinaciones se realizaron por triplicado.



Determinación de humedad

Se determinó el peso fresco de una muestra (A), se llevó a secar a estufa a 104°C durante 24 horas. Finalmente se determinó el peso de la muestra seca (B). Se calculó el contenido de humedad (C) según se indica en la ecuación (1):

$$C = \frac{A-B}{A} 100\% \quad (1)$$

Acondicionamiento de la fruta

Una vez caracterizada, se seleccionó la fruta con un diámetro de alrededor de 30mm y se cortó en rodajas de 3mm de espesor.

Pretratamiento: Deshidratación osmótica

Con el fin de disminuir el tiempo de secado, la fruta se sometió a un proceso previo de deshidratación osmótica. Durante el proceso se realizó un tratamiento con ácido cítrico para evitar el pardeamiento de la fruta.

Las rodajas se colocaron, distribuidas cuidadosamente, en bandejas de secado perforadas, que se sumergieron en una solución osmótica de sacarosa al 60% y ácido cítrico al 1%, durante 3 horas, a una temperatura de 25°C.

Transcurrido dicho periodo de tiempo, las rodajas fueron lavadas con agua destilada, para evitar excesos de sacarosa en la superficie de las mismas y finalmente se eliminó el exceso de agua.

Preparación de la solución de hidrocoloide para el recubrimiento.

La solución de hidrocoloide se preparó a partir de almidón, (Unilever, Argentina) al 5% p/v, glicerol (Mallinckrodt) 20% p/p de polímero y agua destilada. Luego se procedió a la formación de la solución filmogénica, mediante calentamiento a 85°C durante 15 minutos. La solución obtenida se colocó durante 15 minutos en un baño ultrasónico a fin de eliminar burbujas de aire.

Aplicación del recubrimiento

Finalizada la deshidratación osmótica, se procedió al recubrimiento de las frutas con la solución filmogénica. La aplicación del recubrimiento se realizó por inmersión de las rodajas de banana en la suspensión durante 1 minuto y posterior escurrido.

Secado

Se realizó el secado de rodajas de banana sin tratamiento (control), rodajas de banana deshidratadas osmóticamente (OI) y rodajas de banana deshidratadas osmóticamente y recubiertas (OIR). El secado de todas las muestras de rodajas de banana se realizó en una estufa con circulación forzada de aire a 60°C durante 20 horas.

Caracterización de las rodajas de banana deshidratada

Las rodajas de banana deshidratada se almacenaron en un ambiente de humedad relativa de 0%, empleando silica gel. Se determinó el contenido de humedad final y se obtuvieron las isotermas de sorción.

Determinación de humedad

Se determinó el contenido de humedad de las rodajas de banana deshidratadas, de acuerdo al procedimiento indicado previamente para la fruta fresca.

Isotermas de sorción

Se determinaron las isotermas de sorción para los tres grupos de muestras de rodajas de banana deshidratadas (control, OI, OIR). Se establecieron ambientes de humedad relativa constante para cubrir actividades de agua, desde 0.5 a 0.9, utilizando soluciones salinas ($Mg(NO_3)_2$, NaBr, NaCl, KCl, $BaCl_2$) de acuerdo a las recomendaciones del proyecto europeo COST-90 (Spiess & Wolf, 1983). Las muestras se mantuvieron almacenadas durante una semana en desecador con silica gel. Luego, las rodajas de banana se pesaron y se colocaron sobre mallas plásticas, sostenidas por trípodes dentro de recipientes con cada solución salina cerrados herméticamente. Los diferentes recipientes se mantuvieron a temperatura constante durante 4 días o más, hasta alcanzar constancia en el peso de equilibrio de las muestras. Los ensayos de absorción se determinaron por triplicado y fueron realizados a 30°C, los resultados se expresan en g agua/ 100g de muestra seca.



Los datos obtenidos se ajustaron mediante el modelo de BET, según se indica en la ecuación (2):

$$w = \frac{w_0 \cdot C \cdot a_w}{(1 - a_w)(1 + (C - 1)a_w)} \quad (2)$$

Donde w es el contenido de humedad de equilibrio (g agua/ 100g de muestra seca), w_0 es el contenido de humedad de la monocapa (g agua/ 100g de muestra seca), C es una constante asociada al calor de sorción de la monocapa.

Evaluación de calidad sensorial

Se llevó a cabo una prueba descriptiva-cuantitativa a fin de determinar la calidad sensorial para cada muestra. Las pruebas se realizaron en el Instituto de Investigación Sensorial de Alimentos (IISA – Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Salta) con panel semi-entrenado de 8 integrantes. A cada miembro del panel se le entregó un formulario de evaluación con la información contenida en la **tabla 1**, donde se listaron los atributos a evaluar (color, sabor, aroma y textura) con sus respectivos puntajes máximos (25, 35, 10, 30). La sumatoria de los puntajes para cada atributo se tomó como puntaje total de calidad sensorial para cada muestra, considerándose óptima si alcanzara los 100 puntos. Cada panelista evaluó seis muestras por duplicado. Las pruebas se realizaron para muestras almacenadas durante 2 días y para muestras almacenadas durante 2 semanas. En todos los casos, las muestras (una rodaja de cada tipo) se presentaron a cada evaluador en una bandeja, codificadas aleatoriamente.

Tabla 1. Formulario de evaluación sensorial

Atributo	Puntaje máximo por atributo	MUESTRA					
COLOR	25						
SABOR	35						
AROMA	10						
TEXTURA	30						
TOTAL	100						

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos para la caracterización inicial de la fruta se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de la fruta fresca

Característica	Valor
SST	17°Brix
pH	4,92
Acidez	0,89%
Humedad	73%

Estas características se consideran adecuadas para la fruta a ser empleada en la elaboración de banana deshidratada. El contenido de azúcar presente en la misma, resulta suficiente para asegurar un producto final de sabor dulce y textura adecuada.

Una vez que se obtuvieron las rodajas de banana deshidratadas, se determinó el contenido de humedad para cada grupo de muestras. En la **Tabla 3** se observa que el menor contenido de humedad final le corresponde a las rodajas de banana con recubrimiento. Los resultados obtenidos, indican que la aplicación del pretratamiento con osmosis y la aplicación de películas comestibles, permite obtener un producto final con una humedad significativamente menor.

Tabla 3. Humedad de las muestras de banana deshidratadas.

Grupo	% de Humedad Promedio
Control	10,60 ± 0,339 ^a
OI	9,89 ± 0,138 ^a
OIR	8,18 ± 0,480 ^b



La actividad de agua (a_w) es un parámetro que indica la disponibilidad de agua en un alimento para que existan reacciones químicas, bioquímicas y desarrollo microbiano. Por esta razón, la actividad de agua es un parámetro empleado como indicador para predecir la vida útil de un alimento. La isoterma de un producto relaciona gráficamente, a una temperatura constante, el contenido de humedad de equilibrio de un producto con la actividad del agua del mismo y permiten realizar un análisis y diseño de procesos de transformación de alimentos, tales como secado, mezcla y envasado de los mismos.

En la **figura 1** se observan los datos de las isothermas de sorción obtenidos a 30°C para las rodajas de banana deshidratadas sin tratamiento, sometidas a deshidratación osmótica previa y deshidratada osmóticamente con recubrimiento de almidón.



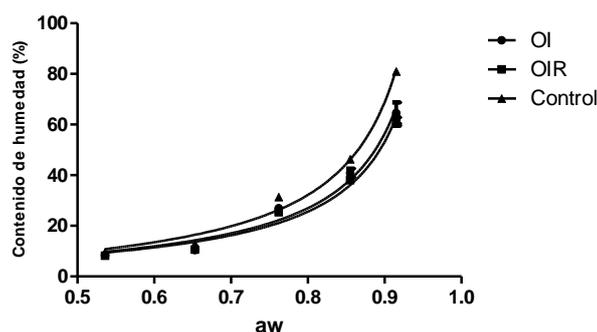


Figura 1. Isotermas de sorción

Las curvas presentan una tendencia exponencial a altas humedades relativas (por encima de 0,75). En el caso de las rodajas de banana deshidratadas sin tratamiento previo (muestras control), la isoterma de sorción se encuentra muy por encima de las isotermas de las muestras OI y OIR, lo que indica que la aplicación de un tratamiento previo al secado, disminuye la capacidad de las muestras de absorber agua, lo que mejora sus condiciones de almacenamiento y la estabilidad del producto. Además, se detectó el desarrollo de microorganismos en las muestras control, a elevados valores de humedades relativas (0.8 y 0.9), en los días finales de los ensayo.

Si bien las rodajas de banana deshidratadas osmóticamente presentan menor contenido de humedad que las muestras control para un mismo valor de actividad de agua, no se observa una diferencia significativa entre las muestras que presentan recubrimiento y las que no.

Los datos experimentales se ajustaron con la ecuación de BET. La calidad del ajuste del modelo se evaluó por medio del coeficiente de correlación lineal (R^2) y el porcentaje de error medio relativo (%E). En la **Tabla 4** se presentan los valores obtenidos para el ajuste del modelo seleccionado.

Tabla 4. Parámetros del modelo de BET y bondad del ajuste.

	W_0	C	R^2	%E
Control	7,271 ^a	1,926	0,9206	8,176
OI	5,843 ^b	2,973	0,9573	3,153
OIR	5,487 ^b	3,405	0,9778	4,670

Calidad sensorial

La **Tabla 5** presenta los resultados derivados de la valoración de atributos sensoriales para cada muestra de rebanadas de banana deshidratadas.

Tabla 5. Resultados de la valoración sensorial

	ATRIBUTOS				TOTAL
	COLOR	SABOR	AROMA	TEXTURA	
Control	18,75±4,27 ^{ab}	24,56±8,41 ^a	9,25±1,29 ^a	23,38±6,23 ^{ab}	75,94±8,07 ^{ab}
Control A	13,81±6,42 ^a	19,88±6,94 ^a	9,19±2,10 ^a	20,25±3,96 ^a	63,13±9,11 ^a
OI	22,13±4,05 ^b	26,56±8,38 ^a	8,38±2,13 ^a	25,94±4,22 ^b	83,01±15,44 ^b
OI A	20,94±0,97 ^b	24,62±1,06 ^a	8,12±0,31 ^a	23,87±0,35 ^b	77,56±5,26 ^{ab}
OIR	22,10±0,71 ^b	26,61±0,09 ^a	8,38±0,03 ^a	25,91±0,97 ^b	83,02±8,35 ^b
OIR A	20,37±0,53 ^b	24,81±0,97 ^a	8,01±0,35 ^a	24,17±1,24 ^b	77,36±7,15 ^b

La puntuación de calidad para el atributo color resultó significativamente menor para la muestra de banana control almacenadas (Control A), lo cual se explicaría por la tonalidad oscura de la zona central de la rebanadas, que fue apareciendo con el tiempo. Debe destacarse que las muestras OI y las OIR con dos semanas de almacenamiento, no resultaron diferentes en el color a aquellas con 48 horas de elaboración.



Respecto al sabor y al aroma, los panelistas no detectaron diferencia entre las muestras, independientemente de si éstas fueron sometidas o no a pre-tratamiento, recubiertas o almacenadas. El sabor se describió, en general, como propio de la fruta, destacando que las muestras control presentaron un sabor muy marcado al principio, que desaparecía paulatinamente, mientras que las muestras OI y OIR, frescas o almacenadas, exhibieron sabor suave a la fruta. El sabor fue el atributo con mayor peso dentro de la puntuación total (35/100), por lo cual, es importante resaltar que el pre-tratamiento y/o el recubrimiento de las hojuelas, no alteró este parámetro a juicio de los evaluadores, lo que significaría que la aplicación de estas tecnologías no influiría en este atributo de calidad del producto.

En lo referido a la textura, el segundo atributo más relevante (30/100), se observó que la muestra control almacenada resultó con la menor puntuación ($p < 0,05$), lo cual se debió a la presencia de gomosidad en el producto. El recubrimiento no influyó en la textura de la fruta deshidratada, permaneciendo en iguales condiciones, según la valoración sensorial, a lo largo del almacenamiento. Igual comportamiento fue advertido en las muestras sometidas sólo al tratamiento osmótico.

Por lo antes descrito, se concluyó que la muestra control almacenada fue la de menor calidad sensorial, dado que obtuvo el menor puntaje total ($p < 0,05$) respecto a las muestras con pre-tratamiento, con o sin recubrimiento, fundamentada en una menor puntuación en color y textura.

Las muestras recubiertas no presentaron diferencias significativas entre sí para la puntuación total, lo cual indicaría que el recubrimiento brinda cierta estabilidad a la fruta deshidratada, destacándose que no confiere sabores ni produce cambios de color significativos. La calidad sensorial de las hojuelas obtenidas por deshidratación osmótica, tampoco resultó diferente respecto a las recubiertas, por lo cual, la estabilidad al almacenamiento parece asociarse a éste tratamiento, que favorece la conservación de la textura crocante y el color amarillo claro.

CONCLUSIONES

A lo largo del estudio realizado se observó que las rodajas de bananas deshidratadas pretratadas con ósmosis inversa con y sin aplicación de recubrimiento permiten conservar las características del producto obtenido tras el almacenamiento.

Si bien, el recubrimiento no generó diferencias significativas en el comportamiento frente a la sorción de agua comparado con las bananas solamente sometidas a ósmosis inversa, la humedad final de las muestras, indican que las bananas con el tratamiento OIR presentan menor contenido de humedad final, lo que indica una mayor estabilidad frente al almacenamiento.

De acuerdo al análisis de las características sensoriales, la muestra control almacenada fue la de menor calidad sensorial respecto a las muestras con pretratamiento, con o sin recubrimiento, debido a la baja valoración del color y la textura. El sabor, atributo con mayor peso dentro de la puntuación total (35/100), no resultó alterado por el pretratamiento y/o el recubrimiento de las hojuelas, lo que significaría que la aplicación de estos tratamientos no influye en este atributo de calidad del producto.

A su vez, se destaca que el panel sensorial no fue capaz de percibir la presencia del recubrimiento comestible empleado, lo que indica que el mismo cumple con este requerimiento para su utilización en la conservación de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Dadzie B.K; Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos. Criterios y métodos. Gaspareto et al; Influencia del Tratamiento Osmótico en el Secado de la Banana Nanica (*Musa cavendishii*, L.) en Secador de Lecho Fijo; Información tecnológica. v.15 n.6 La Serena 2004
- Hussain et al; Effect of Sucrose and Glucose Mixture on the Quality Characteristics of Osmotically Dehydrated Banana Slices; Pakistan Journal of Nutrition 3 (5): 282-284, 2004
- Saavedra et al; Evaluación de películas comestibles de almidón de yuca y proteína aislada de soya en la conservación de fresas; NOVA - publicación científica en ciencias biomédicas - ISSN: 1794-2470 vol.8 no. 14 - julio - diciembre de 2010: 121 – 240



Efecto del proceso de alta presión hidrostática sobre el desarrollo de *LISTERIA MONOCYTOGENES* en un producto cárnico

Giménez B.¹, Graiver N.¹, Giannuzzi L.¹, Zaritzky N.^{1,2}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Buenos Aires Argentina.

²Depto. Ingeniería Química, Fac.de Ingeniería, UNLP, La Plata, Buenos Aires Argentina.

belengimenez@live.com.ar

RESUMEN

Listeria es un microorganismo ubicuo que sobrevive mucho tiempo en los alimentos, por lo cual constituye una gran preocupación para la industria agroalimentaria. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento de Alta Presión Hidrostática (APH) sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes* inoculada en carne bovina sometida a un pre-tratamiento con preservadores químicos durante el almacenamiento refrigerado a 4°C y 10°C. El tratamiento de APH afectó el crecimiento de *L. monocytogenes*, observándose una dependencia con la concentración del inóculo; las muestras inoculadas con 10⁵ UFC/ml y tratadas con 400 MPa presentaron crecimiento en las primeras semanas de almacenamiento a ambas temperaturas, mientras que no se encontró crecimiento en las muestras tratadas a 600MPa y almacenadas a 4°C. Las muestras inoculadas con 10³ UFC/ml no presentaron crecimiento para las dos presiones y temperaturas ensayadas. Se puede concluir que la utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en este producto fue efectiva durante las primeras dos semanas de almacenamiento en todas las condiciones ensayadas, disminuyendo la carga bacteriana inicial y siendo más eficiente el tratamiento a 600 MPa que a 400 MPa.

Palabras Clave: alta presión hidrostática, carne vacuna, *Listeria monocytogenes*, color.

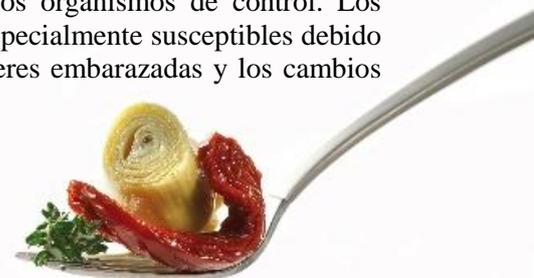
ABSTRACT

Listeria is a ubiquitous organism that survives long periods in food, and is a major concern for the food industry. The aim of this work was to study the effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) on the development of *Listeria monocytogenes* inoculated in beef samples, that were subjected to a pre-treatment with chemical preservatives, during refrigerated storage at 4°C and 10°C. HHP treatment affected the growth of *L. monocytogenes*, showing a dependence on inoculum concentration. Samples inoculated with 10⁵ CFU / ml and treated with 400 MPa showed growth in the first weeks of storage at both temperatures, while growth was not observed in the samples treated at 600MPa and stored at 4°C. The samples inoculated with 10³CFU/ml showed absence of growth at both pressures and temperatures tested. It can be concluded that APH controlled the growth of *Listeria monocytogenes* in the beef product and was effective during the first two weeks of storage under all the conditions tested, decreasing initial bacterial load; besides the treatment was more efficient at 600 MPa than at 400 MPa

Keywords: High pressure, meat, *Listeria monocytogenes*, color.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud de mayor importancia tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (Food and Agriculture Organization, FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) están preocupadas por el aumento en la incidencia de estas enfermedades en las últimas décadas. El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional, representan un desafío tanto para la industria como para los organismos de control. Los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmunosuprimidas, niños, mujeres embarazadas y los cambios



en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA (Salm-Surv, 2005; Alvarez Martínez, 2007).

La listeriosis, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*, es una de las principales enfermedades de transmisión alimentaria y de mayor relevancia en la salud pública debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico (Muñoz *et al.*, 2011).

Listeria monocytogenes es un microorganismo ubicuo que sobrevive mucho tiempo en los alimentos, por lo cual constituye una gran preocupación para la industria agroalimentaria. Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos Gram-positivos cortos, regulares, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C. Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C. Se lo considera un patógeno psicrótrofo, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración (0-8°C.), pueden crecer a 4°C en pocos días a diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas y además es capaz de desarrollarse a pH de 4,4 a 9,6 (Gilmour *et al.*, 2010; Liu, *et al.*, 2006; Muñoz, Díaz., 1998). Asimismo, crece en concentraciones altas de NaCl 10% y sobrevive a concentraciones entre 16 y 20%. (Schöbitz *et al* 2009, Marzocca, *et al.* 2004).

El patógeno a pesar de no formar endosporas es capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, en las plantas procesadoras de alimentos y en el interior de los refrigeradores. *L. monocytogenes* ha sido aislada de alimentos sin procesar como leche, carne y vegetales y de alimentos procesados como quesos suaves, helado, mantequilla, carne cruda, carne procesada, pescado crudo y ahumado en frío. A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis generalmente se relacionan con aquellos productos listos para el consumo, los cuales se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los alimentos contaminados después del procesamiento térmico (FAO, 2000).

Una de las tecnologías emergentes en ciencia de los alimentos con un gran potencial en el área de productos cárnicos que podría usarse para el control de este microorganismo es la alta presión hidrostática (APH), que es un proceso no térmico de preservación de alimentos con mínimos efectos en el contenido nutricional del mismo. El tratamiento de APH por encima de 300 MPa a temperatura ambiente puede mejorar la seguridad microbiológica y extender la vida útil del producto (Balasubramaniam y Farkas, 2008 y Carlez *et al.*, 1994). Asimismo, el tratamiento APH conserva mejor el sabor (Schindler *et al.*, 2010) que el tratamiento térmico, ya que sólo afecta a enlaces no covalentes (Cheftel y Culioli, 1997). La eficacia del proceso depende de parámetros tecnológicos como la presión, mantenimiento de temperatura y tiempo, así como del tipo y estado fisiológico de los microorganismos y de las propiedades intrínsecas del alimento (pH, aw) (Bover-Cid *et al.*, 2011; Hugas *et al.*, 2002; Hereu *et al.*, 2012; Jofré *et al.*, 2009; Díez, 2009). En el caso de carne bovina el tratamiento de APH afecta los parámetros de color, atenuando significativamente la tonalidad roja característica. La decoloración en carnes frescas pigmentadas es producida a niveles superiores a 300 MPa, por lo cual se necesita un tratamiento previo de la carne bovina con preservadores químicos que permite la formación de nitrosomioglobina, una proteína que tiene la característica de ser más resistente a las altas presiones, manteniendo un color adecuado en la superficie del producto.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de APH sobre el color y el desarrollo de *Listeria monocytogenes* inoculada en carne bovina sometida a un pre-tratamiento con preservadores químicos durante un almacenamiento refrigerado a 4°C y 10°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Para el ensayo se utilizaron cortes de músculos aductor femoris y semimembranoso (nalga). Los músculos se separaron luego de 48 horas postmortem y se eliminó grasa visible y se extrajeron discos (diámetro 6cm y espesor 3mm). Las materias primas tenían un valor de pH entre 5.4 y 5.7.

Tratamiento químico

El proceso involucró un tiempo de difusión de sales en secciones de carne bovina, que se sumergieron durante 2.5 h en la solución de inmersión compuesta por: 0.62g/L NaNO₂, 8.5g/L ácido ascórbico y 30g/L NaCl.



Preparación del inóculo y proceso de inoculación

Se realizó un ensayo con muestras que fueron inoculadas con *Listeria monocytogenes* cepa L261, (cultivo provisto por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP).

Inicialmente se realizó la activación de la cepa, para ello se descongelaron las mismas, se tomó 1 ml del cultivo y se sembró en un tubo con TSB (caldo triptona soja), se incubó por 24 hs a 37°C. Al día siguiente, se tomó 1 ml del caldo crecido y se sembró nuevamente en un tubo con TSB. Se realizaron 3 repiques.

Posteriormente a la etapa de tratamiento químico de la muestra, se inoculó cada una de forma individual con 100 µl de un cultivo de 24 h de *Listeria monocytogenes*. El ensayo se llevó a cabo utilizando dos concentraciones de inóculo 10^3 y 10^5 UFC/gramo de tejido cárnico.

Envasado de las muestras

Las muestras de carne inoculadas y las muestras sin inocular se envasaron individualmente al vacío en bolsas Cryovac BB4L (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina) y se sometieron al proceso de alta presión hidrostática (APH).

Aplicación de APH

El tratamiento de APH se llevó a cabo en un sistema de Stansted Fluid Power (modelo FPG9400:922, cilíndrico de 2 litros de capacidad, presión máxima de trabajo 900MPa, rango de temperatura: de -20 a 120°C) en el Laboratorio del INTA Castelar. La velocidad de presurización con la que operó el equipo fue de 300 MPa/min y la despresurización se realizó instantáneamente.

Se utilizaron dos niveles de presión 400 y 600 MPa. El tiempo de proceso de APH fue de 5 min. La temperatura de trabajo fue $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Almacenamiento refrigerado

Luego del tratamiento de las muestras se almacenaron refrigeradas a 4°C y 10°C. Se incluyeron dos controles: 1) CF: discos de carne inoculadas y no presurizadas y 2) CS: carne sometida al tratamiento químico, inoculada y no presurizada.

Determinaciones de cloruro y nitrito

La cantidad de NaCl presente en el tejido después del tratamiento se determinó mediante un electrodo selectivo (Cole-Parmer 27.502-12) y la determinación de nitrito se llevó a cabo utilizando el kit Hach Nitriver 3 (método 371), según Graiver *et al.* (2006).

Determinación de parámetros de color

Se realizó con un colorímetro triestímulo Minolta C400 el cual utiliza la escala de color CIE Lab*, mediante la cual el color es descrito por los parámetros de luminosidad L*, y de cromaticidad a* y b*. Las determinaciones se realizaron semanalmente sobre 3 rodajas de carne, obteniendo 6 medidas para cada muestra.

Actividad acuosa

Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento que y la APH sobre la aw de las muestras. Se realizó en un equipo Aqua Lab Serie 3 (Decagon Devices, USA) calibrado con una solución de K₂SO₄ (aw= 0.979 ±0.005) y agua bidestilada (aw=1). Las medidas fueron realizadas a 25°C por duplicado.

Determinación de textura

Se empleó la sonda Volodkevich (HDP/VB). Esta sonda permite simular la mordedura de un alimento con los incisivos (Wen-Ching *et al.* 2007), lo que corresponde al primer contacto de una rodaja de carne con la boca. Se determinó en cada caso la fuerza máxima alcanzada cuando se realiza una compresión hasta el 30% del espécimen. Se determinó semanalmente sobre 3 rodajas, en cada una de ellas por triplicado.

Análisis microbiológico

Semanalmente se analizó el desarrollo microbiano de *L. monocytogenes* en los productos mediante recuento en placa (medio PALCAM) agar PALCAM, que contiene cloruro de litio, polimixina B, acriflavina y ceftazidima. Se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C. Se utilizó para los ensayos microbiológicos carne fresca inoculada como control.

Además se realizó un ensayo de presencia-ausencia en los casos donde no se encontró desarrollo de *Listeria*. El método de cultivo convencional consta de un procedimiento de enriquecimiento basado en la utilización de medios de cultivo líquidos que contengan agentes selectivos para tratar de recuperar las células de *L. monocytogenes* en estado subletal. Se pesaron 25 g de la muestra en una bolsa de stomacher, se agregó 225 ml de caldo TSB al que se le adicionó acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida y se homogeneizó durante 2 minutos ± 0.2 minutos en Stomacher. Se incubó durante 24 h ± 2 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software SYSTAT (SYSTAT Inc., 1990, v. 10.0). Las diferencias significativas entre las medias fueron determinadas por el método de la menor diferencia significativa, LSD ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de nitrito y cloruro

Las concentraciones de nitrito de sodio y cloruro de sodio en las muestras cárneas luego del tratamiento fueron: 0.0017 ± 0.0011 g $\text{NaNO}_2/100$ g tejido y 1.67 ± 0.05 g $\text{NaCl}/100$ g tejido cárneo para muestras sometidas a 400 MPa y 0.0016 ± 0.0005 g $\text{NaNO}_2/100$ g tejido y 1.73 ± 0.09 g $\text{NaCl}/100$ g tejido cárneo para muestras sometidas a 600 MPa, cumpliéndose con lo que establecido en la normativa vigente. El uso de nitrito de sodio, nitrato de potasio o de su combinación no debe superar los 200 ppm (0.2 mg / g), expresado en nitrito de sodio en el producto final (USDA-FSIS 1999).

Actividad acuosa

Se observó que tanto las presiones empleadas, la temperatura y el tiempo de almacenamiento refrigerado no influyeron significativamente en la actividad acuosa del producto, siendo el valor medio de 0.9857 ± 0.0009 .

Color

En trabajos previos (Giménez *et al.* 2014) se observó que al someter las muestras cárnicas a APH sin aplicar ningún tratamiento químico previo se perdía el color rojo característico de la misma, obteniéndose un resultado inaceptable para el consumidor. Sin embargo, el tratamiento químico propuesto del producto cárnico previo al APH, permite la formación de nitrosomioglobina manteniendo un color adecuado en la superficie del producto, ya que es un pigmento más estable a las altas presiones debido a su mayor resistencia a la oxidación comparado con la mioglobina y la oximioglobina (Rubio *et al.*, 2007).

Del análisis de varianza realizado se encontró que la luminosidad L^* se vio afectada significativamente tanto por el tiempo de almacenamiento como por las presiones ensayas no siendo significativa la temperatura. Las interacciones dobles entre estas variables afecta significativamente este parámetro. Las muestras sometidas a 400 MPa presentaron un menor valor de L^* que las muestras sometidas a 600 MPa (Figura 1 a, b) a ambas temperaturas de almacenamiento, esto concuerda con lo expuesto por Bak *et al.* (2012) quien reportó que el aumento de la presión por encima de 300 MPa conduce a un pequeño aumento en la luminosidad.

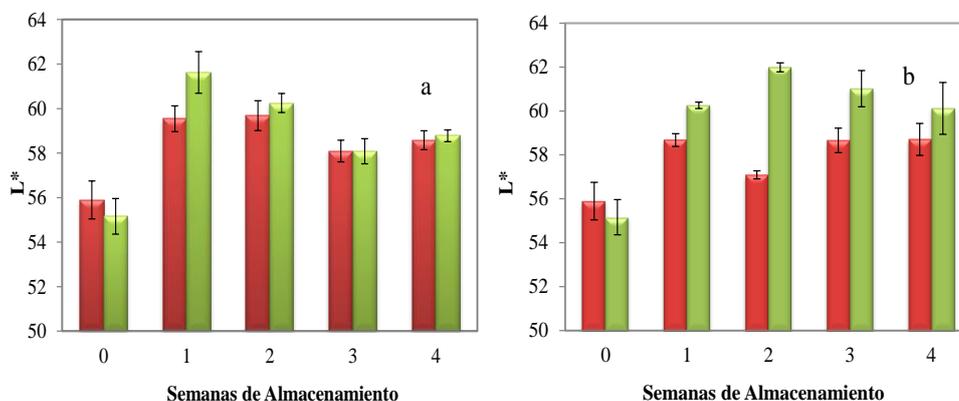


Figura 1: Variación de la luminosidad (L^*) de las muestras cárneas en función del tiempo para las presiones: (—) 400MPa y (—) 600MPa, almacenadas a las temperaturas: a) 4°C y b) 10°C.

El parámetro a^* dependió significativamente ($P < 0.05$) de la presión ensayada, de la temperatura de almacenamiento, del tiempo y de la interacción entre estos tres factores. En función de las presiones, las muestras tratadas a 400 MPa presentaron un mayor valor de a^* comparadas con las muestras tratadas a 600 MPa; esto se debe al efecto de las altas presiones sobre las proteínas sarcoplásmicas. En la Figura 2 a, b puede observarse que a ambas presiones hay una disminución del parámetro a^* durante el tiempo de almacenamiento; Jung *et al.*, (2003) relacionaron la disminución del valor de a^* durante el almacenamiento con la acumulación de metamioglobina en la muestra. En función de la temperatura, se observó que las muestras almacenadas a 4°C presentaron un mayor valor de a^* que las muestras almacenadas a 10°C. Sin



embargo en todos los casos, los valores obtenidos de a^* fueron adecuados para el producto desarrollado ($a^* > 14$).

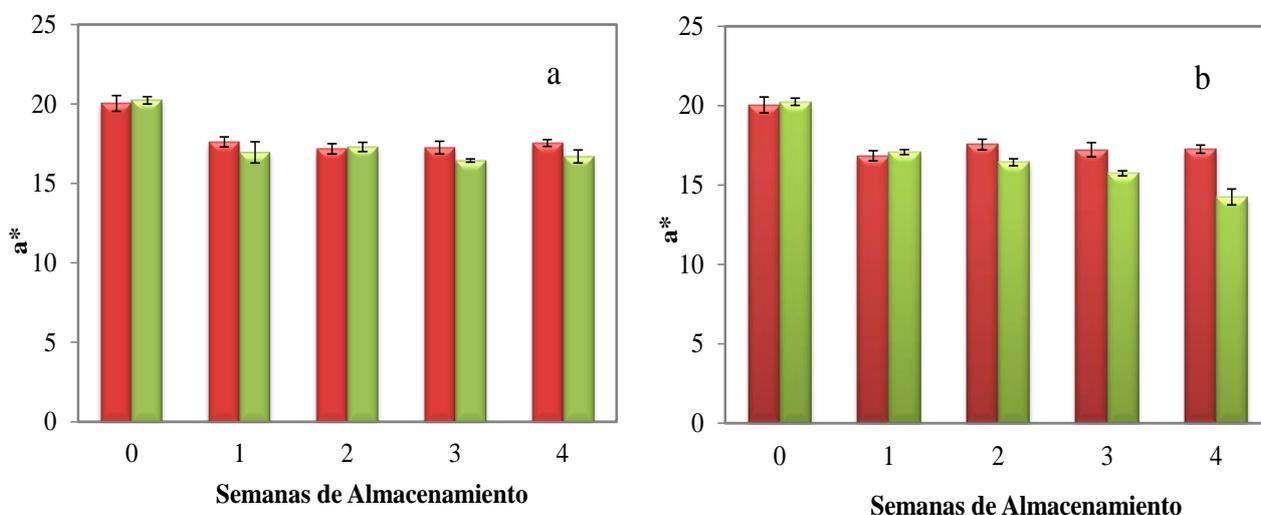


Figura 2: Variación de la parámetro a^* en las muestras cárnicas en función del tiempo para las presiones: (—) 400MPa y (—) 600MPa, almacenadas a las temperaturas: a) 4°C y b) 10°C.

También se midieron los parámetros L^* , a^* en la muestra sin tratamiento (carne fresca, CF) obteniéndose los valores: $L^* 39.59 \pm 0.15$, $a^* 20.28 \pm 0.12$.

Textura

Se encontró que la fuerza máxima dependió significativamente ($P < 0.05$) de la presión ensayada y de la temperatura de almacenamiento, no así del tiempo.

En todos los casos las muestras tratadas a 600MPa mostraron mayores valores de fuerza máxima que aquellas sometidas a 400MPa (**Figura 3 a, b**), pudiéndose relacionar con el mayor exudado producido al incrementar la presión que conduce a un tejido muscular con menor contenido de humedad.

La **Tabla 1** permite observar que para muestras sometidas a las mismas presiones de tratamiento, aquellas que fueron almacenadas a 10°C presentaron mayores valores de fuerza máxima que las almacenadas a 4°C.

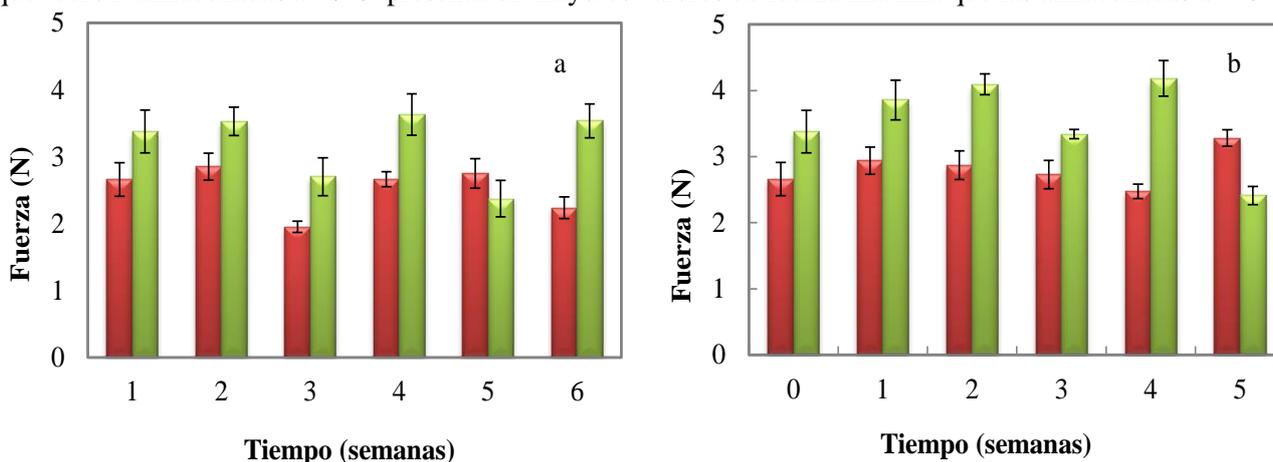


Figura 3: Variación de la fuerza máxima en función del tiempo de almacenamiento refrigerado para las dos APH ensayadas (—) 300MPa y (—) 600MPa a las dos temperaturas: a) 4°C y b) 10°C



Tabla 1: Efecto de las presiones ensayadas y la temperatura sobre la fuerza máxima en las muestras cárnicas.

Temperatura (°C)	Presión (MPa)	Fuerza (N)
4	400	2.52±0.09a
10	400	2.83±0.08b
4	600	3.19±0.13c
10	600	3.54±0.73d
CF	0	2.43±0.36

Análisis microbiológico

El crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos viene influenciado por factores intrínsecos (pH, aw, nutrientes, etc.) propios del alimento y extrínsecos (temperatura, humedad relativa, etc.) propios de zona de procesamiento y almacenamiento. Asimismo, su crecimiento también viene determinado por la presencia de algunos compuestos como el NaCl, el lactato o los nitratos y nitritos (Vitas *et al*, 2004), presentes en la composición de productos cárnicos.

La **Figura 4 a,b** corresponde a muestras inoculadas con 10^3 UFC/g y almacenadas a dos temperaturas diferentes 4°C (**Fig 4 a**) y 10°C (**Fig 4 b**). Podemos observar que las muestras tratadas con la solución de aditivos químicos, inoculadas y sometidas a APH en los dos niveles de presión y almacenadas tanto a 4°C como a 10 °C, presentaron recuentos por debajo del límite de detección (2 log UFC/g) lo cual significa que las altas presiones afectaron a las bacterias, impidiendo así su desarrollo normal. Debe señalarse la notoria disminución del recuento inicial después del tratamiento con altas presiones disminuyendo la concentración microbiana en alrededor de 3 ciclos logarítmicos.

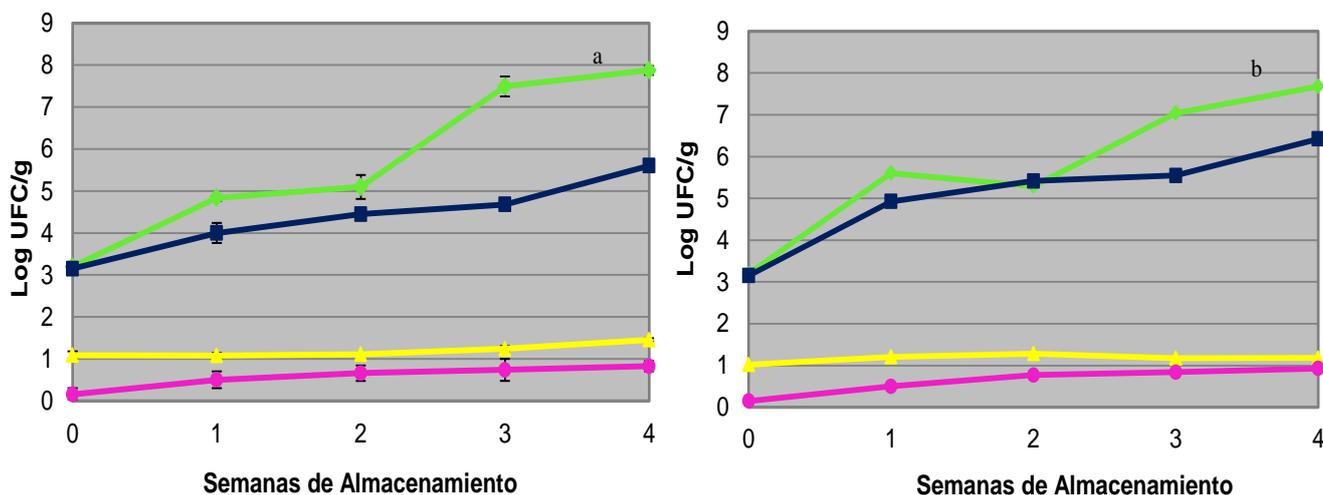


Figura 4: Recuentos de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento a: a) 4°C y b) 10°C, de (●) carne fresca, (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos, (▲) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 400 MPa y (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 600 MPa.

En cambio las muestras frescas (CF) y las tratadas con la solución de aditivos químicos (CS) que fueron inoculadas, presentaron un recuento por encima de 3 log UFC/g, aumentando a lo largo del almacenamiento refrigerado. En el caso de las muestras almacenadas a una temperatura de refrigeración de 10°C, se observó un crecimiento mayor.



La **Figura 5** corresponde a muestras inoculadas con 10^5 UFC/g y almacenadas a dos temperaturas: 4°C (**Fig 5 a**) y 10°C (**Fig 5 b**). En el caso de las muestras tratadas con APH se observa que las muestras sometidas a 600 MPa presentaron un menor crecimiento que las muestras sometidas a 400 MPa, evidenciando el mayor efecto que produce las altas presiones sobre las bacterias, sin embargo el hecho de tener una mayor cantidad de inóculo inicial podría provocar un efecto de protección en las bacterias que permitiría luego en el almacenamiento el crecimiento de las mismas. Con respecto a las temperaturas de almacenamiento, no se observó crecimiento a 4°C para las muestras tratadas a 600 MPa durante todo el almacenamiento y en el caso de las muestras tratadas a 400 MPa, durante la primera semana no se registró crecimiento microbiano. En cambio a 10°C, se notó crecimiento durante la primera semana para 400 MPa y luego de la segunda semana para el tratamiento de 600 MPa, llegando a una concentración final igual para todas las muestras. Se observa que las bacterias que fueron sometidas a APH presentan una cinética de crecimiento distinta a la de las muestras no sometidas a altas presiones; esto podría deberse a una adaptación de la bacteria luego de estar expuesta a condiciones adversas.

Bozoglu *et al* (2004) estudiaron el efecto de la alta presión hidrostática sobre la *L. monocytogenes* y encontraron que luego de un tratamiento a 450 y 550 MPa estas bacterias se vieron afectadas pero que durante el almacenamiento refrigerado a 4°C, hay un proceso completo de reparación que podría deberse a la naturaleza psicrotrófica de dichas bacterias. Si bien no se conocen aún los sitios en que se producen los daños celulares de las bacterias, podrían afectarse por la APH la pared celular, la membrana citoplasmática, ADN, ARN y ciertas enzimas dependiendo de la cepa específica.

Con respecto a las muestras frescas (CF) y las tratadas con la solución de aditivos químicos (CS) que fueron inoculadas, éstas presentaron un mayor recuento al inicio y se obtuvo al término del almacenamiento una concentración final similar a la presentada por las muestras inoculadas con una menor concentración de bacterias.

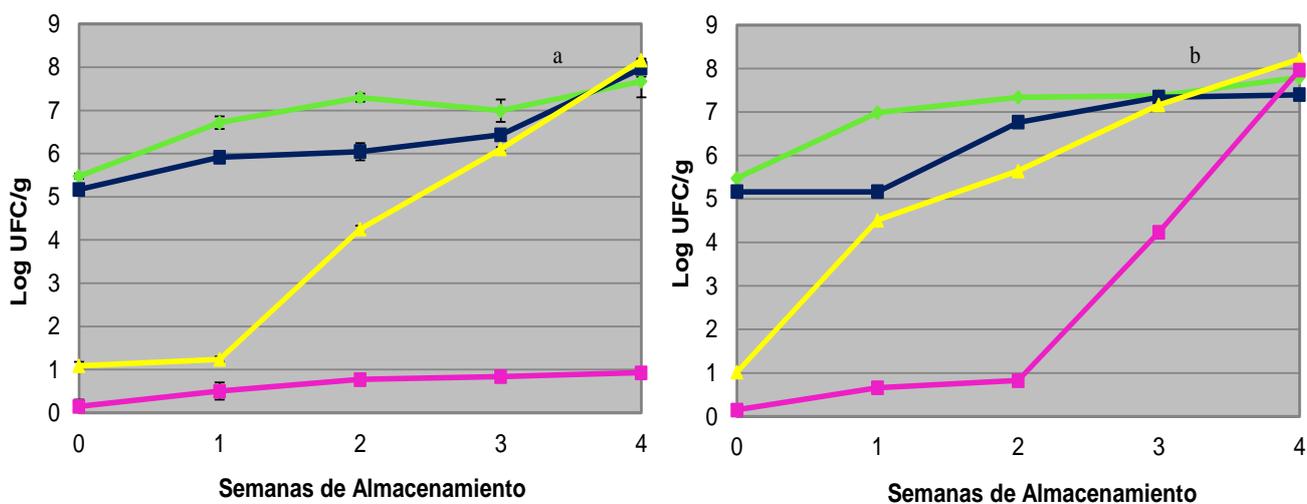


Figura 5: Recuentos de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento a) 4°C y b) bacterias 10°C, de: (●) carne fresca, (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos, (▲) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 400 MPa y (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 600 MPa.

Para ambas concentraciones de inóculo se observa que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento refrigerado a las dos temperaturas 4 y 10°C, en la carne con el pretratamiento químico es similar al obtenido en la carne fresca, por lo que podemos concluir que el tratamiento químico previo no produce un efecto bacteriostático; esto podría deberse a la capacidad de este patógeno a crecer en elevadas concentraciones de NaCl y a la baja concentración de nitrito en la muestra. Estos resultados concuerdan con lo observado por Myers *et al.* (2013).

Las recomendaciones del Código Alimentario Argentino (CAA) para asegurar la calidad de este tipo de productos son que se debe tener ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra.



En el ensayo de presencia-ausencia realizado en las muestras donde no se observó desarrollo, luego del enriquecimiento y siembra en placa se encontró la presencia de *Listeria monocytogenes*, por lo que podemos concluir que el tratamiento de alta presión hidrostática no elimina este patógeno de las muestras cárnicas, sino que dependiendo de la presión aplicada produce daño que puede repararse durante el almacenamiento.

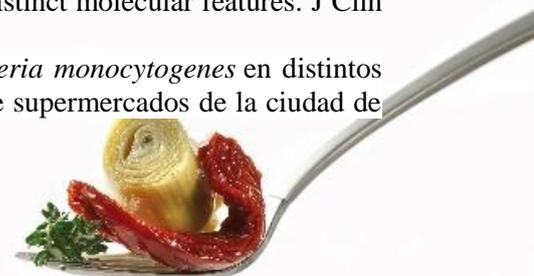
CONCLUSIONES

Se puede concluir que la utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico fue efectivo para disminuir los recuentos iniciales después del tratamiento.

Durante las primeras dos semanas de almacenamiento en todas las condiciones ensayadas, se observó disminución de la carga bacteriana inicial, siendo más eficiente el tratamiento a 600 MPa que a 400 MPa. Además se concluye que los parámetros de textura y color de las muestras cárnicas se modificaron debido al proceso de APH y el almacenamiento refrigerado, aunque presentaron valores adecuados para su consumo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Martínez N. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella* entérica. Tesis doctoral 2007. Departamento de Biología Funcional Área de Microbiología. Universidad de Oviedo, España
- Bak, K. H., Lindahl, G., Karlsson, A. H., Lloret, E., Ferrini, G., Arnau, J., Orlie, V. 2012. High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Science*, 90: 690–696.
- Balasubramaniam, V. M., & Farkas, D. 2008. High-pressure food processing. *Food Science and Technology International*, 14, 413–418
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. 2011. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*, 28: 804-809.
- Bozoglu F., Hami A., Gönül K. 2004. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40: 243-247
- Carlez, A., Rosec, J. -P., Richard, N., & Cheftel, J. -C. 1994. Bacterial growth during chilled storage of pressure-treated minced meat. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 27, 48–54.
- Cheftel, J.C., Culioli, J. 1997. Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46: 211–236.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo 6. Alimentos cárneos y afines. Artículo 286 tris - (Resolución Conjunta SPReI N°178/2012 y SAGyP N° 714/2012).
- Díez, A.M., Santos, E. M., Jaime, I.Rovira, J. 2009. Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of Morcilla de Burgos. *MeatScience*, 81: 171-177.
- Gilmour M.W., Graham M., Domselaar G.V., Tyler S., Kent H., Trout-Yake K.M., *et al.* 2010. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* 11:1471-85.
- Giménez, B., Graiver, N., Califano, A., Zaritzky, N. 2015. Physicochemical characteristics and quality parameters of a beef product subjected to chemical preservatives and high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 100, 179–188
- Hereu A., Bover-Cid S., Garriga M., Aymerich T. 2012. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogene*. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 107–112
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model Technology. *Meat Science*, 62: 359-371.
- Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N., Garriga, M. 2009. Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenient meat products. *Food, Science and Technology*, 42: 924-928.
- Liu D., Lawrence L.M., Gorski L., Mandrell R.E., Ainsworth A.J., Austin F.W. 2006. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *J Clin Microbiol*, 44:214-7.
- Marzocca, M., Marucci, P., Sica, M., Alvarez, E. 2004. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de



Bahía Blanca, Argentina. Revista Argentina de Microbiología 36: 179-181

Muñoz A. I., Díaz G. 1998. Listeriosis. Santafé de Bogotá: INVIMAINS; p. 64.

Muñoz A. I., Vargas M., Otero L., Díaz G., Guzmán V. 2011. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. Biomédica 31:428-39

Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S., Sebranek, J. 2013. Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. Meat Science, 94, 69–76

Rubio, B., Martínez, B., García-Cachan, M. D., Rovira, J. Jaime, I. 2007. Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured beef “Cecina de Leon”. Innovation Food Science and Emerging Technologies, 8(7), 102-110.

Salm-Surv, 2005. En: <http://www.who.int/salmsurv/GSSProgressReport2005.pdf>

Schöbitz R., Ciampi L., Nahuelquin Y. 2009 *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. Agro Sur 37(1): 1-8

Vitas, A.I., Aguado, V., García-Jalón, I. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 90, 349–356.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Bilateral entre Argentina (MINCYT) y China: “Safety improvement and shelf life extension of fresh and cooked beef and mutton products applying non-thermal technologies” coordinado por el Dr. Sergio Vaudagna del INTA. Agradecemos al Dr. Sergio Vaudagna y al INTA de Castelar por permitirnos usar el equipo de APH.



Estudio de genuinidad de frutas confitadas por análisis micrográfico

Giménez L. A. S. ⁽¹⁾, Vignale N. D. ⁽¹⁾, Gurni A. A. ⁽²⁾

⁽¹⁾INECOA, UNJu-CONICET y LABOSyE⁽²⁾ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.

gimenezleila2013@hotmail.com

RESUMEN

Las frutas confitadas son utilizadas especialmente en la industria de la panificación. Con el objetivo de determinar los caracteres de valor diagnóstico de tres frutas tropicales y evaluar la calidad de los productos derivados “confitados”, se estudiaron diez ejemplares de cada una y diez productos de ellas comercializadas en la ciudad de San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina. Se realizó observación macroscópica tanto de las frutas como de sus productos “confitados” y, posteriormente, el análisis microscópico correspondiente. Se emplearon las técnicas de raspado, disociado leve y reacción histoquímica con Lugol. Los caracteres de valor diagnóstico para “kiwi” fueron gránulos de almidón y ráfides; en “mango”, granos de almidón, cristales heteromórficos y fibras; en “papaya”, cristales (drusas), esclereidas agrupadas, gotas lipídicas y tubos laticíferos. Se verificó 70% de genuinidad en confitados procedentes de “kiwi” y 60% para “papaya” y “mango”. Se concluye que existe deficiencia de calidad botánica y que es necesario contribuir en su mejoramiento. La simple, rápida y segura metodología implementada en este estudio resulta adecuada para lograr este propósito.

Palabras claves: micrografía, fruta confitada, genuinidad de vegetales.

ABSTRACT

Candied fruits are specially used in baker industry. In order to establish the main features for three tropical fruits and evaluate the quality of their candied derivated products, ten samples of each fruit and ten commercial samples of the products from San Salvador de Jujuy, province of Jujuy, Argentina, were analyzed. Macroscopic and microscopic observation on both fruits and products were performed. Scrapping, mild disgregation and reaction with iodine/iodide solution were the applied micrographic techniques. The diagnostic features for “kiwi” were starch grains and raphids; for “mango” starch grains, heteromorphic crystals and fibers; for “papaya” clusters, sclereids, lipidic drops and laticiferous tubes. Only 70% genuineness was founded for “kiwi” and 60% for “mango” and “papaya”. It is concluded that there is a great defficiency in botanical quality control of the products and so the necessity to improve it. This simple, quick and accurate methodology showed to be very useful to achieve this goal.

Keywords: micrograph, candied fruit, vegetable genuineness

INTRODUCCIÓN

Las frutas confitadas resultan ser un ingrediente valorado principalmente en la industria de la panificación, así como en repostería, decoración para sorbetería y en dulcería, donde la mayoría de la materia prima proviene de frutas de origen tropical. Para los productos derivados, la certificación de genuinidad produce un impacto económico tanto para los productores como para la industria.

Es interesante destacar que las frutas confitadas le atribuyen el sabor a los productos de panificación en los que son incorporadas y definen su diferenciación en el mercado.

El Código Alimentario Argentino (CAA) incluye en el capítulo X, Artículo 816, la definición de Frutas y Hortalizas confitadas como los productos obtenidos por su cocción reiterada en soluciones de concentraciones crecientes de sacarosa, azúcar invertido o miel hasta quedar completamente impregnados de azúcar (CAA, 2010).

La calidad de una fruta confitada, disponible en el mercado para el consumidor, se expresa mediante la correspondencia unívoca entre la presencia, en el contenido del envase, de la especie que declara el rótulo, provista de las características físicas, químicas, microbiológicas, visuales y olfativas-gustativas particulares.



El presente estudio se posiciona en la consideración de la calidad botánica, que pretende certificar presencia de la parte vegetal comestible que se utiliza como materia prima para la elaboración de productos alimenticios y que se encuentre acorde a la información del rótulo.

Es posible identificar una especie mediante la observación - a ojo desnudo o con ayuda de una lupa, cuando se dispone de un trozo de material con hojas, flores y frutas - y confrontación con los datos requeridos por las claves de determinación provistas por la bibliografía (Vignale y Gurni, 2001). El material objeto de estudio es sometido a procesamientos mecánicos y/o tratamientos térmicos, de modo que dichos caracteres exomorfológicos no resultan perceptibles por lo que es necesario recurrir al análisis de los caracteres anatómicos. Para ello se aplica el método micrográfico del que se seleccionan las técnicas apropiadas al material de estudio (Gurni, 2014). De este modo, se definen los caracteres de valor diagnóstico, los que varían según cuál sea el órgano vegetal de cada especie empleado como materia prima (Cañigueral *et al.*, 1998; Vignale y Gurni, 2009; Giménez *et al.*, 2015; 2016). Estos caracteres posibilitan certificar calidad botánica, definiendo el carácter genuino o, eventualmente, contaminación o adulteración de un producto (Flores y Vignale, 2010; Rivas *et al.*, 2009; Varela *et al.*; 2009; Vignale, 2002).

En el presente trabajo se estudiaron tres especies tropicales: *Carica papaya* L. (papaya), *Mangifera indica* L. (mango) y *Actinidia chinensis* var. *hispida* C.F. Liang (kiwi) cuyas frutas son muy utilizadas en la industria de “confitados”. Según investigaciones anatómicas preexistentes, gotas lipídicas, tubos laticíferos anastomosados, cristales en forma de drusas y esclereidas agrupadas en “papaya” (Winton y Winton, 1939; Giménez *et al.*, 2016) y granos de almidón, cristales de morfología variada y fibras en “mango” constituyen caracteres relevantes (Winton y Winton, 1939). La ausencia de antecedentes para “kiwi” y la necesidad de validar las referencias anatómicas consignadas mediante el método micrográfico consolidan los argumentos del estudio que se presenta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las muestras de frutas frescas fueron aportadas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Yuto y adquiridas en diferentes puestos de venta de la ciudad de San Salvador de Jujuy, Jujuy.

Las muestras de frutas confitadas proceden de la adquisición en comercios locales de la ciudad de San Salvador.

Material estudiado

Se consigna el número de cada muestra depositada en el muestrario

1. *Carica papaya* L.

a- Fruto fresco

M-CBS: 627; 628; 629; 630; 631; 632; 633; 634; 635; 636.

b- Producto alimenticio

M-CBS: 677; 678; 679; 680; 681; 682; 683; 684; 685; 686.

2. *Mangifera indica* L.

a- Fruto fresco

M-CBS: 637; 638; 639; 640; 641; 642; 643; 644; 645; 646.

b- Producto alimenticio

M-CBS: 687; 688; 689; 690; 691; 692; 693; 694; 695; 696.

3. *Actinidia chinensis* var. *hispida* C.F. Liang

a- Fruto fresco

M-CBS: 647; 648; 649; 650; 651; 652; 653; 654; 655; 656.

b- Producto alimenticio

M-CBS: 667; 668; 669; 670; 671; 672; 673; 674; 675; 676.

Métodos

1.- Confirmación de la identidad taxonómica del material

Se realizó mediante la comparación de las características de morfología externa de las tres frutas con la información bibliográfica.

2. – Observación del producto

Se extiende el material contenido en el envase sobre una superficie blanca y limpia y se separan, por detección a simple vista, todos los elementos componentes; se tomaron fotos con una cámara fotográfica KODAK AF 5X Optical Aspheric Lens.



3. - Aplicación del método micrográfico

Se fundamenta en el análisis de los caracteres anatómicos y de los productos del metabolismo celular descritos previamente (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Gurni, 2014; Gattuso y Gattuso, 1999).

Técnicas

a.- disociado (o disgregado) leve

Consiste en tratar el material con solución acuosa de NaOH al 5%, a ebullición, durante 5 min., para luego lavar con agua destilada y observar al microscopio óptico.

b.- raspado

Consiste en raspar, con un elemento cortante como bisturí, el material en estudio y colocarlo, suspendido en agua destilada, entre porta y cubreobjetos para su observación al microscopio óptico.

c.- reacción histoquímica

Se utiliza para la confirmación de presencia de almidón mediante el tratamiento de la muestra con solución yodiodurada (Lugol) que da color azul violáceo a casi negro. Se coloca una porción del material de estudio sobre un portaobjetos, se agregan 2-3 gotas de solución, se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio óptico.

Se realizaron preparados transitorios de cada fruta y producto que se observaron empleando un microscopio trinocular Carl Zeiss modelo Axiostar Plus; las fotomicrografías se registraron con una cámara de fotografía digital Canon, modelo Powershot A640, adosada al mismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de muestras

Carica papaya L.

Etapa Micrográfica

A.- Raspado

Se identificaron: miembros de vasos espiralados (**Fig. 1. e**), cristales (drusas), gotas lipídicas y tubos laticíferos articulados anastomosados.

B.- Reacción histoquímica

Negativa para detección de almidón.

C.- Disociado leve

Epidermis y estomas (**Fig. 1. a**), gotas lipídicas (**Fig. 1. b**), esclereidas agrupadas (**Fig. 1. c**), tubos laticíferos articulados anastomosados (**Fig. 1. d**), cristales (drusas) (**Figs. 1. f**).

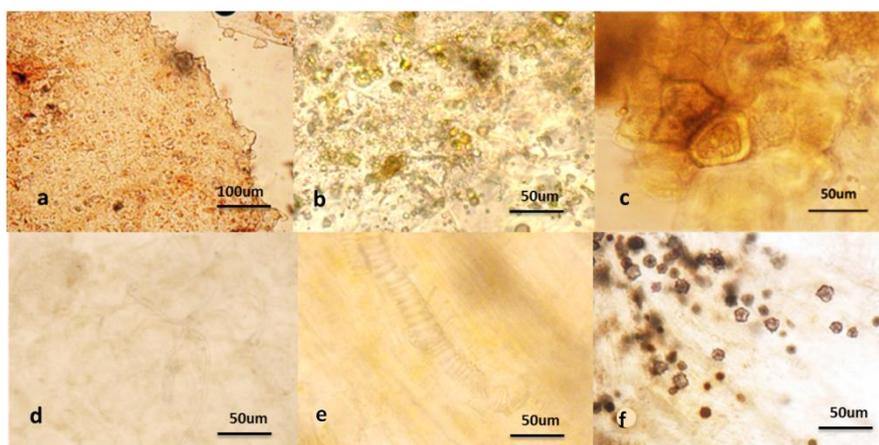


Fig.1. Endomorfología de *Carica papaya L.* disociado leve con NaOH al 5%. a) Epidermis y estomas. b) Gotas lipídicas. c) Esclereidas agrupadas. d) Tubos laticíferos anastomosados. e) Miembros de vasos espiralados y parénquima. f) Drusas.

Mangifera indica L.

Etapa Micrográfica

A.- Raspado

Se identificaron: miembros de vasos espiralados, granos de almidón simples, circulares, con hilio central (**Fig. 2. b**), cristales heteromórficos (prismáticos, romboédricos, alargados) (**Fig. 2. d**) y fibras.



B.- Reacción histoquímica

Positivo para detectar presencia de almidón (Fig. 2. c).

C.- Disociado leve

Parénquima y fragmentos de haces vasculares (Fig. 2. a), cristales heteromórficos (Fig. 2. d), drusas y fibras (Fig. 2. e) y fibras, cristales y parénquima (Fig. 2. f).

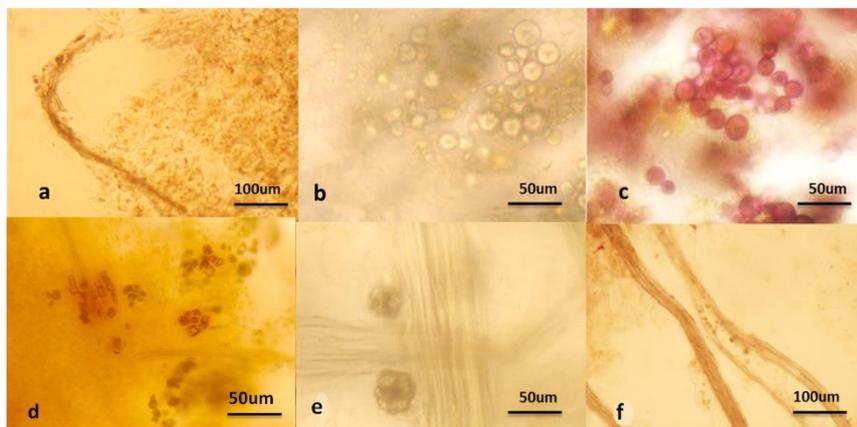


Fig. 2. Endomorfología de *Mangifera indica* L. raspado del material en fresco (b, c) y disociado leve con NaOH al 5% (a, d, f). a) Parénquima y fragmentos de haces vasculares. b) Granos de almidón simples y circulares con hilum central. c) Reacción de granos de almidón con Lugol. d) Parénquima y cristales heteromórficos. e) Drusas y fibras. f) Fibras.

Actinidia chinensis var. *hispida* C.F. Liang

Etapa Micrográfica

A.- Raspado

Se identificaron almidones simples elipsoideos y/o esféricos sin estrías visibles (Fig. 6. b) y ráfides agrupados (Fig. 3. d).

B.- Reacción histoquímica

Positivo para detectar presencia de almidón (Fig. 3. c).

C.- Disociado leve

Parénquima y fragmentos de haces vasculares (Fig. 3. a), ráfides agrupados (Fig. 3. e).

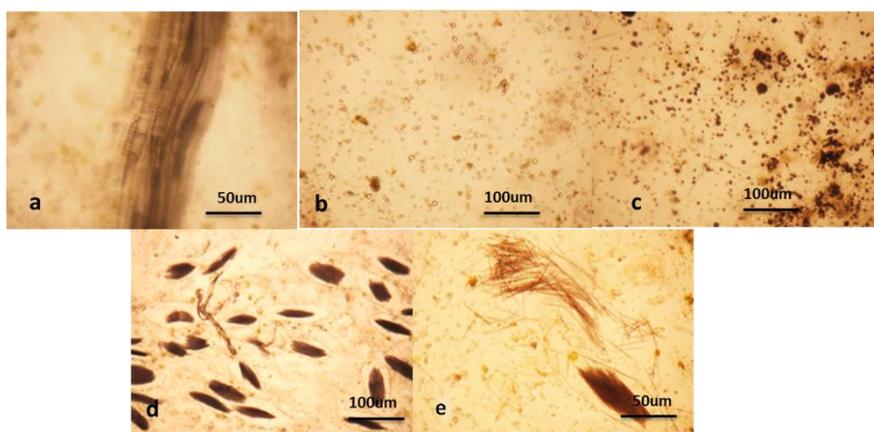


Fig. 3. Endomorfología de *Actinidiabchinensis* var. *hispida* C.F. Liang. raspado del material en fresco (b, c) y disociado leve con NaOH al 5% (a, d, e). a) Parénquima y fragmentos de haces vasculares b) Granos de almidón simples sin estrías visibles c) Reacción histoquímica de almidón con Lugol d) Ráfides agrupadas, Parénquima e) Ráfides.

La aplicación de las técnicas micrográficas permitió confirmar la presencia de gotas lipídicas, tubos laticíferos anastomosados y cristales en forma de drusas en frutas de “papaya”, según describieran Winton y



Winton (1939) e identificar una nueva referencia procedente de tejido esclerenquimático, las esclereidas agrupadas (Giménez *et al*, 2016).

Se constata la presencia de granos de almidón mediante la reacción histoquímica con Lugol.

Constituye un dato relevante y aplicable en análisis de calidad botánica de alimentos que no son sometidos a temperaturas de cocción, ya que el calor provoca desnaturalización, impidiendo su visualización.

La presencia de granos de almidón simples, circulares, cristales (heteromórficos y drusas) y fibras se destacan en “mango” mientras que kiwi” presenta rafidios y granos de almidón simples. Los restantes elementos, parénquima y miembros de vasos, resultan comunes en todas las muestras, motivo por el cual son desestimados como indicadores.

Como se menciona en trabajos similares de Gurni y col. (2000), Flores y Vignale (2008), Giménez y col. (2015, 2016), los productos del metabolismo celular, en éste caso granos de almidón y cristales, representan un importante carácter identificatorio en estudios de calidad.

CONCLUSIONES

Los indicadores micrográficos propuestos se aplicaron en el análisis de calidad botánica de productos confitados, revelando 70% de genuinidad para “kiwi” y 60% para cada uno de los restantes (**Tabla.1**).

Tabla 1: Calidad botánica micrográfica de 30 productos confitados derivados de “kiwi”, “papaya” y “mango”, procedentes de comercios de S. S. de Jujuy

Productos confitados derivados de:	Raspado	Disociado Leve	N° de productos que evidencian calidad botánica	N° de productos con ausencia de caracteres diagnóstico
<i>Carica papaya</i> L. (papaya)	Tubos laticíferos anastomosados	Tubos laticíferos anastomosados, gotas lipídicas y drusas.	6 (seis)	4 (Cuatro)
<i>Mangifera indica</i> L. (mango)	Fibras. Granos de almidón ausentes.	Fibras y cristales (heteromórficos y drusas).	6 (seis)	
<i>Actinidiachinensis</i> var. <i>hispidula</i> C.F. Liang (kiwi)	Ráfides agrupadas. Granos de almidón ausentes.	Ráfides.	7 (siete)	3 (Tres)
Total			19	11

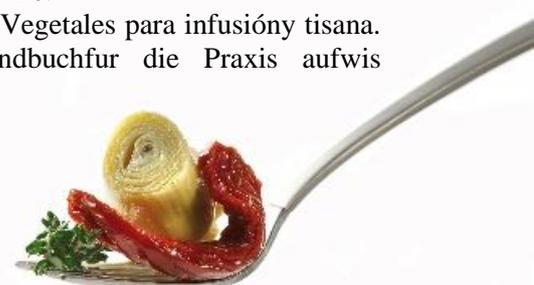
Esta nueva perspectiva de análisis posibilita acrecentar de forma positiva los controles de calidad conocidos que se realizan a los alimentos. Permite también que tome importancia la botánica, que tiene como fin mejorar los controles en los agroproductos derivados, garantizando que los mismos sean genuinos, correspondiendo a la materia prima indicada en su rotulación y buscando el bienestar de los consumidores.

Resulta importante destacar que a través de estas técnicas que pertenecen al método micrográfico, es posible buscar la certificación de calidad botánica, como es el caso de los productos de frutas confitadas, a pesar de los tratamientos a los que debe ser sometido su materia prima para lograr el punto deseado.

BIBLIOGRAFÍA

Alcalde San Miguel, P. (2009). Calidad. 1° Ed. Paraninfo. S. A. España. pp. 2-16.

Cañigueral, S., Vila, R. y Wichtl. M. (1998). Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para infusión y tisana. 1° edición española. (Traducción de edición original: Teerdrogen: ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage). OEMF Internacional SRL. Milán.



- Código Alimentario Argentino. 2010. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
Consulta: 20/10/2016
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2010. Fichas técnicas de Procesado de Frutas. <http://www.fao.org/3/a-au168s.pdf> Consulta: 15/09/2016
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Editorial Hemisferio sur. Buenos Aires. pp. 83.
- Folgar, O. F. (1996). ISO 9000 Aseguramiento de la Calidad. Ediciones. Macchi. Bs As. Argentina.
- Flores, E. N. y Vignale, N. D. (2010). Caracterización micrográfica de órganos vegetativos y reproductivos de interés etnobotánico de *Geoffroeadecorticans* (Gil. ex Hook. et Arn.) Burkart (FABACEAE). En: Pochettino, M. L., Ladio A. y Arenas P. M. (eds.) 2010. Tradiciones y transformaciones en etnobotánica. Ed. Cyted. S. S. de Jujuy. pp. 330-335.
- Gattuso, M. A. y Gattuso, S. J. (1999). Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Universidad Nacional de Rosario. REUN. AUGM. UNESCO. RIPROFITO. Rosario.
- Giménez, L. A. S., Vignale, N. D. y Gurni, A. A. (2015). Determinación de Parámetros Micrográficos en *Passiflora edulis* Sims para el Control de Calidad Botánico de productos derivados en Jujuy (ARGENTINA). XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos – CONACYTA. 26-29 de octubre. Ciudad de Quillabamba – Cusco Perú. Libro de Resúmenes: CONACYTA. pp. 35-36.
- Giménez, L. A. S., Vignale, N. D. y Gurni, A. A. (2016). La microscopía y su aplicación en la identificación de especies y en el control de calidad de agroalimentos. 4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC). 6 – 8 Abril. Bariloche – Argentina. Libro de Resúmenes: Acta Microscópica, Vol. 25 Supp. A. 35 pp. 20 – 21.
- Gurni, A. A. (2014). Técnicas histológicas en investigación. En: Histología vegetal. Técnicas simples y complejas. Zarlavsky, G. E. Ed. Sociedad Argentina de Botánica. Buenos Aires. pp. 135-140.
- Hurrell, J. A., Ulibarri, E. A., Delucchi, G. y Pochettino, M. L. (2010). Frutas frescas, secas y preservadas. 1° edición. LOLA. Buenos Aires. pp. 322.
- Laskowski, L. E. (2000). Características anatómicas de la hoja y el tallo del semeruco (*Malpighia emarginata* DC) cultivado en dos localidades del Estado Lara. *Bioagro* 12(2):33-40.
- Mezadri, T., S. Fernández-Pachón, D. Villaño, C. García-Parrilla y Troncoso A. (2006). La fruta de acerola: composición, características productivas e importancia económica. Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Alan. Producción editorial en Venezuela. Caracas. Capítulo Venezolano 56 (2): pp 32-33.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO (2004). Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Documentos de la FAO sobre productos básicos y Comercio. Proyecciones al año 2010 pp. 95.
- Pochettino, M. L. (2015). Botánica Económica. Sociedad Argentina de Botánica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. pp. 448.
- Rivas, M. A., Gurni, A. A. y Vignale, N. D. (2009). Caracterización micrográfica de *Solanum betaceum* Cav. (SOLANACEAE), un cultivo andino medicinal. En: Vignale, N. D. y Pochettino, M. L. (eds.) Avances sobre plantas medicinales andinas. CYTED. S. S. de Jujuy. pp. 205-229.
- Varela, B. G., Ganopol, M. J., Bosco, P., Agostinelli, L. y Gurni, A. A. (2009). Presencia de salvado de cereal en "oréganos" comercializados en la ciudad de Buenos Aires (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8: 305 – 307.
- Vignale, N. D. y Gurni, A. A. (2001). Diferenciación de especies equisetiformes utilizadas en medicina tradicional en la provincia de Jujuy, Argentina. *Dominguezia* 17(1):23-30.
- Vignale N. D. y Gurni A. A. (2009). Parámetros micrográficos para identificar doce especies medicinales andinas de Asteraceae de la provincia de Jujuy Argentina. En: Vignale, N. D. y Pochettino, M. L. (eds.) Avances sobre plantas medicinales andinas. CYTED. S. S. de Jujuy. pp. 129-204.
- Vignale, N. D. (2002). Relevamiento y análisis exomorfológico y micrográfico de plantas medicinales de la puna y prepuna jujeñas, con especial referencia a la Reserva de Biósfera Laguna de Pozuelos, Jujuy, Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
- Winton, A. L. y Winton, K. B. (1939). The structure and composition of foods. Volume IV. Sugar, sirup, honey, tea, coffee, cocoa, spices, extracts, yeast, baking powder. John Wiley & Sons INC. New York.



AGRADECIMIENTOS

A SeCTER-UNJu por el financiamiento de los Proyectos “Plantas andinas de interés etnobotánico de la subregión centro-oeste sudamericano: caracterización micrográfica de órganos útiles y parámetros de calidad de semillas” (08/A175) y “La etnobotánica, la micrografía y la calidad de semillas de la flora y agrobiodiversidad de la Región Surandina Tropical y Chaqueña orientadas a la conservación” (08/A182) que posibilitaron la realización del presente trabajo.



Estudio de la estabilidad física y de la actividad antimicrobiana de una nanoemulsión de aceite esencial de lemongrass

González M.M.^{1,2}, Campos C.A.^{1,2}, Gliemmo M.F.^{1,2}.

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias, CABA, Argentina.

(2) CONICET, Argentina.

gonzmalena@gmail.com

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron seleccionar un aceite esencial con acción inhibitoria del desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*; obtener una nanoemulsión del aceite seleccionado para evaluar su actividad antimicrobiana; estudiar el efecto del tiempo de sonicación sobre su estabilidad y su acción antimicrobiana. Se realizó un ensayo de difusión en agar de varios aceites esenciales y se seleccionó el aceite esencial de lemongrass (AEL). Se elaboraron dos nanoemulsiones sometidas a sonicación por 5,0 y 25,0 minutos. Se almacenaron a 25°C y se midió el diámetro de gota en el tiempo. Para estudiar la acción antimicrobiana se dispensaron en microplacas diferentes diluciones de la nanoemulsión de AEL, se inocularon con la levadura, se incubaron y se registró la absorbancia. De los aceites esenciales testeados, el AEL fue el que mostró mayor acción antimicrobiana. El diámetro de las nanoemulsiones disminuyó con el tiempo de almacenamiento. Se observó que a mayor concentración del AEL, menor fue el crecimiento de *Z. bailii*. La MCI fue de 467 ppm. La estabilidad y la acción antimicrobiana de la nanoemulsión fueron independientes del tiempo de sonicación. Lograr una nanoemulsión de AEL estable en el tiempo permitiría su uso para preservar alimentos.

Palabras clave: nanoemulsiones, aceite esencial de lemongrass, *Z. bailii*, ultrasonido.

ABSTRACT

The aims of this study were to select an essential oil with inhibitory action on *Zygosaccharomyces bailii* growth; to obtain an oil nanoemulsion to evaluate its antimicrobial activity; to study the effect of sonication time on its stability and antimicrobial action. Diffusion on agar assay was performed on several essential oils and lemongrass (AEL) was selected. Two nanoemulsions sonicated for 5.0 and 25.0 minutes were drawn. They were stored at 25°C and the droplet diameter was measured over time. To study the antimicrobial action, different dilutions of AEL nanoemulsion were dispensed into microplates, they were inoculated with the yeast, incubated and the absorbance was recorded. Of the tested essential oils, AEL was the one who showed the highest antimicrobial action. The diameter of the nanoemulsions decreased with storage time. It was observed that the higher the concentration of AEL, the lower the growth of *Z. bailii*. The MIC was 467 ppm. Stability and antimicrobial action of the nanoemulsion were independent of sonication time. Achieving a stable nanoemulsion AEL through time allows its use to preserve food.

Keyword: nanoemulsions, lemongrass essential oil, *Z. bailii*, ultrasound.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) son compuestos aromáticos de origen natural, con actividades biológicas de amplio espectro (Asbahani et al., 2015). Hasta hoy, han sido utilizados como saborizantes, aromatizantes, como medicamentos o cosméticos (Dima y Dima, 2015), insecticidas, antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-alérgicos, y agentes anticancerígenos (Seow et al., 2014). Sin embargo, muchos AE ejercen fuerte actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica, estimulando su aplicación también como antimicrobianos naturales en productos alimenticios y bebidas (Burt, 2004). El uso de AE como conservantes en alimentos ha ganado una considerable atención en los últimos años, impulsado principalmente por la percepción negativa de los consumidores sobre conservantes sintéticos (Seow et al., 2014). Sin embargo, su alta reactividad y hidrofobicidad representan un desafío formidable para su incorporación directa en productos alimentarios y bebidas.



Para conservar su estabilidad, actividad biológica y minimizar al mismo tiempo el impacto sobre las propiedades sensoriales de los alimentos a los que se incorporan, los AE necesitan ser encapsulados para que sean compatibles con las matriz alimentaria (Buranasuksombat et al., 2011), por ejemplo en emulsiones. Por otra parte, las emulsiones a escala nanométrica o nanoemulsiones, también ofrecen ventajas adicionales tales como la minimización del impacto sobre las propiedades sensoriales de los productos alimentarios, así como un aumento de la bioactividad y mejor difusión (Donsì et al. 2012, 2011).

Las nanoemulsiones son dispersiones de aceite en agua con un diámetro de gota dentro del rango de 10 a 100 nm (Mc Clements, 2011). Las potenciales ventajas de las nanoemulsiones por sobre las convencionales como la alta estabilidad física, alta biodisponibilidad, alta transparencia y baja viscosidad las hacen atractivas para su aplicación en la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos. Las nanoemulsiones sirven como agentes de liberación de compuestos bioactivos lipofílicos como sabores (Chang, 2012) y agentes antimicrobianos (Mc Clements, 2007) en la industria de alimentos. El ultrasonido es un equipo de alta energía que sirve para desarrollar nanoemulsiones. Este método es una técnica rápida y eficaz para la formulación de nanoemulsiones estables con un diámetro de gota muy pequeño y baja polidispersidad (Lin, 2008). El equipo utiliza ondas sonoras con una frecuencia de más de 20 kHz utilizando un sonotrodo para causar ondas mecánicas seguido de cavitación. El colapso de estas cavidades genera un choque de ondas potentes que rompe las gotas gruesas (Behrend et al. 2000). El tamaño de gota se puede controlar mediante la optimización de los parámetros de proceso como la concentración de aceite o de emulsionante, tiempo de sonicación y la energía entregada (Nakabayashi et al., 2011).

Hasta la fecha, las investigaciones que se han llevado a cabo para apoyar el uso de las nanoemulsiones de AE como antimicrobianos en productos alimenticios son escasas. Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron: a) seleccionar un aceite esencial con acción inhibitoria del desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256; b) obtener una nanoemulsión estable a 25°C del aceite esencial seleccionado a pH 4,00; c) evaluar su actividad antimicrobiana frente al crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud a pH 4,00; y d) estudiar el efecto del tiempo de sonicación sobre la estabilidad y la acción antimicrobiana de la nanoemulsión.

MATERIALES Y MÉTODOS

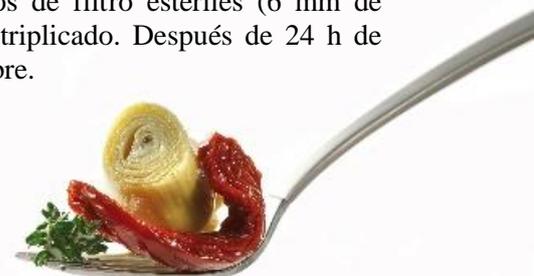
El caldo, agar Sabouraud y peptona utilizados fueron de Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia). El glicerol (Sintorgan S.A., Argentina), el Tween 80 (Biopack, Argentina), el colorante cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT), y el mediador 2-metoxi-1-4 naftoquinona (Sigma Aldrich, Estados Unidos de América) fueron de grado analítico. Los aceites esenciales de albahaca (*Osimum basilicum*), salvia (*Salvia officinalis*), jengibre (*Zingiber officinale*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), naranja (*Citrus sinensis dulcis*), pomelo (*Citrus paradisi var. rouge la toma*), estragón (*Artemisia dracunculus*), lavanda (*Lavandula latifolia*), menta (*Mentha piperita*), bergamota (*Citrus aurantiuml. subsp. bergamia*), laurel (*Laurus nobilis*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*) fueron de origen natural (EUMA S.A., Argentina) y el de canela fue similar al natural (Sigma Aldrich, Estados Unidos de América).

Preparación del inóculo de *Zygosaccharomyces bailii*

A partir de una cepa de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 almacenada a $-20,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en caldo Sabouraud, con 10,0g/100g de glicerol, se elaboró un inóculo. Para ello, la levadura fue descongelada, una alícuota fue transferida a caldo Sabouraud y posteriormente incubada a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs. Luego, el inóculo se centrifugó a 7500 rpm por 15 minutos (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemania). Al pellet obtenido luego de la centrifugación se le agregó 1mL de peptona (1,5 g/100 g). Antes de ser utilizado, el inóculo se diluyó en agua peptona hasta alcanzar 0,5 unidades McFarland, correspondiente a una población aproximada de 10^6 UFC/ml.

Testeo de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Se testeó la actividad antimicrobiana de varios aceites esenciales (albahaca, salvia, jengibre, eucalipto, naranja, pomelo, estragón, lavanda, menta, bergamota, laurel, lemongrass, canela) frente a *Z. bailii* a través del ensayo de difusión en agar (Lv et al., 2011). Las placas que contenían agar Sabouraud solidificado fueron sembradas en superficie con 1 ml del inóculo diluido de la levadura. Luego, del secado de las placas en estufa a 25°C durante 45 minutos, sobre la superficie se colocaron discos de filtro estériles (6 mm de diámetro, Oxoid) y se sembraron con 10 μL de cada aceite esencial por triplicado. Después de 24 h de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ se midieron los diámetros de inhibición con un calibre.



Preparación de las nanoemulsiones

Se formularon nanoemulsiones utilizando aceite esencial de lemongrass (AEL), Tween® 80 como emulsificante y agua destilada. El pH fue ajustado a 4,00 con el agregado de ácido cítrico al 50,0% p/p. El pH se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (Estados Unidos de América). La concentración del AEL se fijó en 30000 ppm y la de Tween 80 en 9000 ppm, para todas las nanoemulsiones preparadas. En una primera instancia, en condiciones estériles, se elaboró una emulsión gruesa. Para ello, una mezcla de agua destilada y Tween® 80 se esterilizó a 100°C durante 30 minutos. Luego, en condiciones estériles se le adicionaron 30000 ppm del AEL y se realizó la emulsión gruesa en un homogeneizador de alta velocidad (Ultra turrax, IKA, Alemania) durante 1 minuto a 13500 min⁻¹ para formar la emulsión y luego 3 minutos a 24000 min⁻¹ para reducir el tamaño de gota.

La emulsión gruesa fue dividida en dos partes, las cuales se sometieron a sonicación por 5,0 y 25,0 minutos, respectivamente. Para ello se utilizó un procesador ultrasónico (modelo VCX 750, Vibra CellSonics, Estados Unidos de América) en condiciones constantes de frecuencia de 20 kHz y amplitud de 20% (amplitud máxima 40%, 228 μm). Se utilizó una sonda de aleación de titanio de 13 mm roscada a una micropunta cónica de 3 mm para someter a ultrasonido 10 ml de solución. Las muestras contenidas en tubos de ensayo de vidrio fueron inmersas en un baño de enfriamiento con una camisa por la que circulaba glicerina a temperatura constante de 0,5°C (Polystat, Cole-Parmer, Estados Unidos de América) para disipar la mayor parte del calor producido durante la sonicación. Las emulsiones se almacenaron a 25°C por 7, 10, 14 y 28 días, tiempos a los cuales se les midió la estabilidad y la acción antimicrobiana, como se describe más adelante.

Caracterización y estabilidad de las emulsiones

Para caracterizar las emulsiones y estudiar su estabilidad a lo largo del almacenamiento a 25°C (7, 10, 14, 28, 56 y 65 días), se determinó el tamaño de gota por dispersión dinámica de luz. Para ello, se colocaron 1,2 ml de muestra en una cubeta de poliestireno descartable y se utilizó un equipo Zetasizer Nano-Zs provisto de un láser de He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) y un correlador digital Modelo ZEN3600, en un ángulo de dispersión fijo de 173.

La técnica de dispersión dinámica de luz mide la difusión de gotas debido al movimiento browniano y esto se relaciona con el tamaño de gotas a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$dh = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

donde d_h es el diámetro hidrodinámico, D , el coeficiente de difusión traslacional, k , la constante de Boltzmann, T , la temperatura absoluta y η , la viscosidad. La distribución de tamaños obtenida se basa en la intensidad de luz dispersada y se puede convertir en distribuciones en intensidad, en volumen o en número. En este trabajo se mostrarán las dos primeras.

Por otra parte, para comparar el tamaño de gotas de los sistemas, se utilizó el parámetro Z average que es el tamaño promedio del conjunto de gotas. Cabe destacar que este parámetro es útil para hacer comparaciones pero no da una descripción completa de la distribución en sistemas polidispersos.

Estas determinaciones se realizaron por quintuplicado y se informó el valor promedio.

Evaluación de la actividad del aceite de lemongrass sobre el crecimiento de *Z. bailii*

Para cada tiempo de almacenamiento en condiciones estériles, se realizaron distintas diluciones de las nanoemulsiones de 30000 ppm de AEL en caldo Sabouraud ajustado a pH 4,00 con ácido cítrico al 50,0% p/p, obteniendo sistemas de concentraciones de 1875, 1250, 935, 467 y 311 ppm de AEL. Luego, se dispensaron alícuotas de 180 μl de cada sistema en una microplaca de 96 pocillos. A cada pocillo se le adicionaron 10 μl de caldo que contenía el inóculo de *Z. bailii*, alcanzando una población de 1.10⁶ UFC/ml. La microplaca se incubó a 30°C ± 1°C por 48 hs y durante el almacenamiento, se midió el crecimiento a través del registro de la absorbancia a 600 nm cada 1 h luego de agitar 30 s antes de cada lectura. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas y se recolectaron con el software Gen 5 (BioTekInstruments, ELx808, Estados Unidos de América). Como control positivo se utilizó caldo Sabouraud a pH 4,00 inoculado y como controles negativos se utilizaron los sistemas ensayados sin inocular. Éstos últimos también se utilizaron como blanco de absorbancia. El ensayo se realizó al menos por cuadruplicado.

Para identificar los sistemas en los que se registró crecimiento, se utilizó cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT) como indicador redox junto con 2-metoxi-1-4 naftoquinona como mediador de electrones. Para ello, se utilizó la técnica de Tsukatani et al. (2014) con algunas modificaciones.



Se preparó una solución de 2,775 mM de INT en agua destilada y una solución 1 mM del mediador en dimetilsulfóxido. Ambas soluciones se esterilizaron por filtración por membrana de 0,22 μm (Micron Separaciones Inc., Estados Unidos de América). Antes de utilizarlos, se realizó una mezcla INT:mediador en proporción 9:1. Luego de 48 hs de incubación de la microplaca, se adicionaron 10 μL de esta mezcla a cada pocillo y, después de 2 h de contacto, se evaluó el viraje del indicador. Se determinó la mínima concentración inhibitoria (MCI) del AEL como la menor concentración a la cual no se observó viraje del indicador en comparación con controles negativos y positivos. Este ensayo se realizó con ambas nanoemulsiones (5 y 25 minutos de sonicación).

Por otra parte, se seleccionó la nanoemulsión con 5 minutos de sonicación y 28 días de almacenamiento para verificar la MCI obtenida a través de un ensayo de muerte. Para ello, se elaboraron un sistema control de caldo Sabouraud y los sistemas conteniendo 467, 935 y 1875 ppm del AEL, todos a pH = 4,00. Los sistemas se almacenaron a 25°C y a diferentes tiempos se midió el crecimiento mediante el recuento de viables en placa con agar Sabouraud.

Análisis de datos

Para establecer diferencias entre los diámetros de los halos de inhibición y los valores de Z average, se aplicó el análisis de varianza y la prueba de mínima diferencia significativa (LSD). En todos los casos, la significancia estadística se evaluó a un nivel del 5% (alfa = 0,05) y los análisis se realizaron utilizando Statgraphics Plus para Windows, versión 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MD, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Testeo de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

En la **Tabla 1** se muestran los diámetros de los halos de inhibición de los aceites esenciales testeados. Debe destacarse que en este ensayo, el aceite de canela sólo se utilizó como control ya que en estudios previos (Gliemmo et al., 2016) se observó que tenía significativa acción antimicrobiana. Uno de los objetivos de este trabajo fue seleccionar otro aceite con potencial acción antimicrobiana. El AEL fue el que mostró mayor actividad frente a *Z. bailii*, obteniéndose un halo de $17,8 \pm 1,9$ mm, seguido por los aceites de menta y de bergamota. En base a estos resultados, se decidió seleccionar el AEL para continuar con los ensayos posteriores.

Tabla 1. Promedio de halos de inhibición de los aceites esenciales testeados en agar Sabouraud.

Aceite Esencial	Halo (mm)
Albahaca (<i>Osimum basilicum</i>)	14,0 \pm 1,0
Salvia (<i>Salvia officinalis</i>)	Sin halo
Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	Sin halo
Eucalipto (<i>Eucalyptus citriodora</i>)	Sin halo
Naranja (<i>Citrus sinensis dulcis</i>)	Sin halo
Estragón (<i>Artemisia dracunlus</i>)	12,0 \pm 1,0
Pomelo (<i>Citrus paradisivar. rouge la toma</i>)	Sin halo
Laurel (<i>Laurus nobilis</i>)	12,5 \pm 1,0
Lavanda (<i>Lavandula latifolia</i>)	11,0 \pm 1,0
Bergamota (<i>Citrus aurantiuml. subsp. bergamia</i>)	14,1 \pm 1,3
Menta (<i>Mentha piperita</i>)	17,0 \pm 1,0
Lemongrass (<i>Cymbopogon citratus</i>)	17,8 \pm 1,9
Canela	24,5 \pm 2,4

Evaluación de la estabilidad de las emulsiones

La distribución en intensidad de las gotas de todas las emulsiones fue bimodal, con tamaños en el rango de 12 a 19 nm, correspondientes al pico de mayor intensidad. Con respecto a la distribución del tamaño del volumen, se observó un solo pico alrededor de 10 nm para todas las emulsiones y tiempos de almacenamiento ensayados. Este resultado indica que las gotas del pico con mayor intensidad observado en la distribución de intensidad corresponden a la mayor población de gotas de las emulsiones. Para ilustrar estos resultados, a modo de ejemplo, en la **Figura 1** se muestran las distribuciones de tamaños por intensidad



y por volumen de las emulsiones con 5 y 25 minutos de sonicación a los 28 días de almacenamiento. El resto de los tiempos ensayados mostró un comportamiento similar.

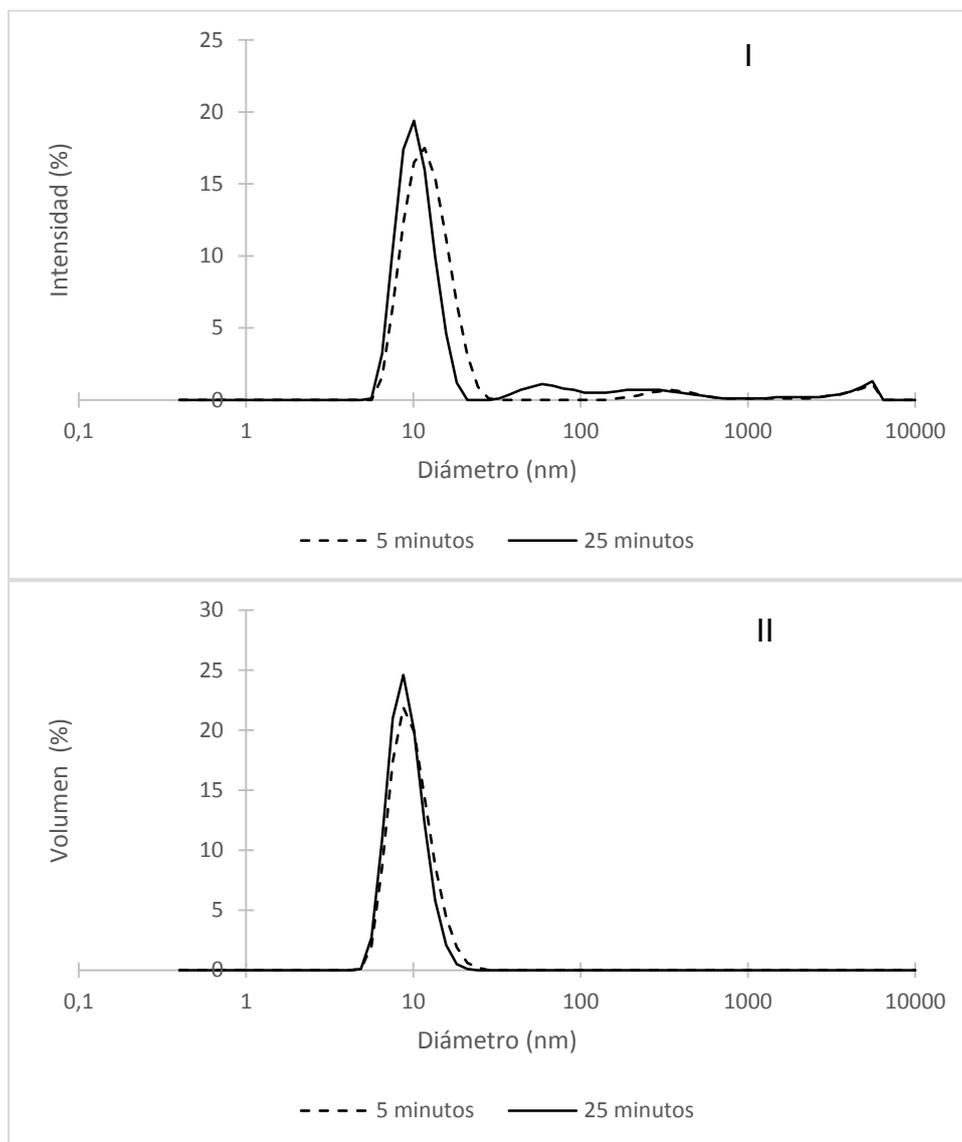
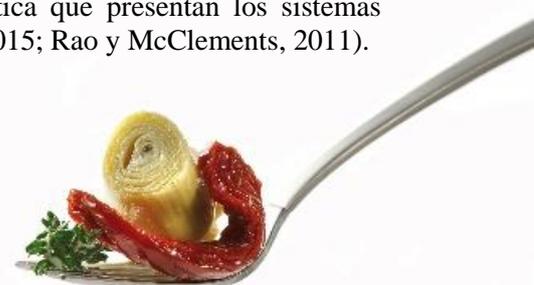


Figura 1. Distribución de tamaños de gotas por intensidad (Panel I) y por volumen (Panel II) de las nanoemulsiones de aceite esencial de lemongrass con 5 y 25 minutos de sonicación, luego de 28 días de almacenamiento a 25°C.

En la **Figura 2** se muestran los valores de Z average en función del tiempo de almacenamiento. En la misma puede observarse que el diámetro de las gotas fue inferior a 20 nm para cualquier tiempo de almacenamiento, indicando que se lograron elaborar nanoemulsiones. Por otra parte, se observa que el diámetro de las nanoemulsiones disminuyó con el tiempo de almacenamiento, pudiéndose obtener medidas repetitivas a partir de los 10 días de elaboración. Se obtuvo una emulsión estable hasta al menos 65 días de almacenamiento con un diámetro promedio de 12,7 nm para la emulsión de 5 minutos de sonicación y 12,3 nm para la de 25 minutos, no habiendo diferencias significativas entre ambos valores. La tendencia a la reducción de tamaño con el tiempo de almacenamiento también fue observada para una nanoemulsión de aceite esencial de naranja, cuyo tamaño de gota disminuyó desde su elaboración hasta las 4 semanas de almacenamiento alcanzando un valor de 15 nm (Hashtjin y Abbasi, 2015). Este comportamiento se vincularía con la disminución gradual de la alta barrera de energía cinética que presentan los sistemas emulsionados hasta que alcanzan el equilibrio cinético (Hashtjin y Abbasi, 2015; Rao y McClements, 2011).



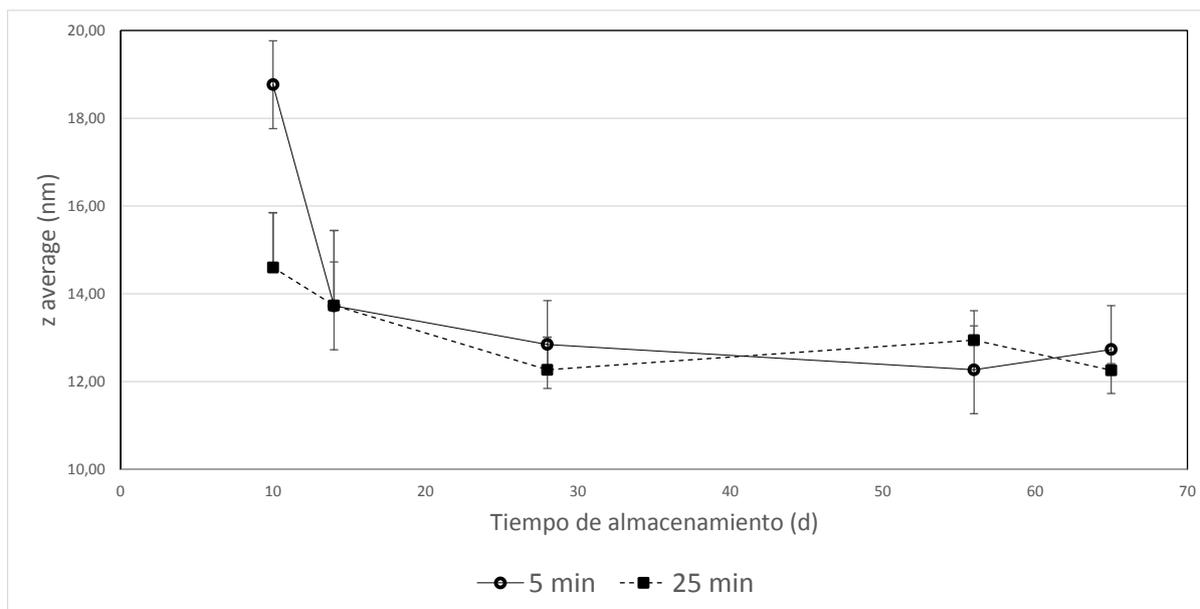


Figura 2. Efecto del tiempo de almacenamiento y del tiempo de sonicación (5 y 25 minutos) sobre el valor de Z-average de las nanoemulsiones de aceite esencial de lemongrass.

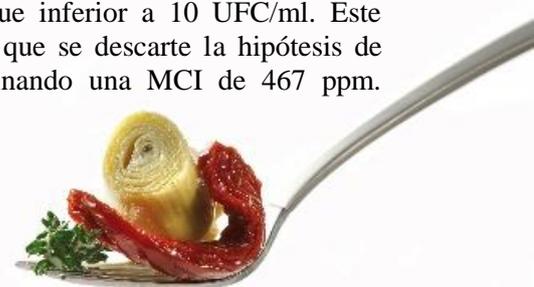
Cabe destacar que las emulsiones elaboradas con el homogeneizador de alta velocidad (emulsiones gruesas) mostraron ser muy turbias, de color blanco, y luego de ser sometidas a ultrasonido, las emulsiones fueron transparentes. Esta transparencia fue independiente del tiempo de sonicación y del almacenamiento.

Evaluación de la actividad del aceite de lemongrass sobre el crecimiento de *Z. bailii*

Con los datos de absorbancia obtenidos se construyeron las curvas de crecimiento de la levadura. A modo de ejemplo, en la **Figura 3** se muestran las curvas de crecimiento de los sistemas elaborados con la nanoemulsión de 5 minutos de sonicación a los 28 días de almacenamiento. Cabe destacar que las curvas mostraron un comportamiento similar para el resto de los tiempos de almacenamiento y también para las emulsiones con 25 minutos de sonicación. Como era de esperar, se observó que a mayor concentración del AEL, fue menor el crecimiento de *Z. bailii*. Sin embargo, a concentraciones mayores o iguales a 467 ppm los patrones de las curvas de crecimiento fueron similares, es decir, mostraron una pendiente positiva hasta un valor de alrededor de 0,5 unidades de absorbancia para luego mantenerse aproximadamente alrededor de ese valor hasta el final del ensayo. En estos pocillos, podía observarse un sedimento blanquecino en el fondo del pocillo luego de la incubación. Este comportamiento fue independiente del tiempo de sonicación. Para dilucidar si ese aumento de absorbancia se debía al crecimiento o a la formación de un precipitado se realizaron dos ensayos. Uno de ellos fue adicionar un indicador redox (INT) para testear la presencia de células viables en los pocillos y el otro, fue realizar un ensayo de muerte mediante el recuento de viables en placa de la levadura a lo largo de la incubación de un sistema control de caldo Sabouraud y de los sistemas conteniendo 467, 935 y 1875 ppm del AEL, todos a pH = 4,00. En este caso, se seleccionó la nanoemulsión con el menor tiempo de sonicación (5 minutos), a un tiempo de almacenamiento intermedio (28 días). Esto se debió a que requiere menor energía para su elaboración y su tamaño de gota no difiere significativamente respecto de la emulsión con mayor tiempo de sonicación y a mayores tiempos de almacenamiento.

En el primer ensayo, se observó que el indicador viró de incoloro a rosado (evidenciando crecimiento) en todos los pocillos excepto en los que contenían niveles superiores o iguales a 467 ppm del AEL, independientemente del tiempo de sonicación. Además, la tonalidad del pocillo conteniendo 311 ppm fue de menor intensidad que la del control positivo. Este hecho indicaría la disminución de la velocidad de crecimiento a 311 ppm y la inhibición a concentraciones mayores.

En relación con el ensayo de muerte, el resultado de los recuentos se muestra en la **Tabla 2**. A lo largo de la incubación, la población de *Z. bailii* disminuyó en todos los sistemas conteniendo AEL. En el sistema que contiene 467 ppm el crecimiento fue disminuyendo, y luego de 25 h, fue inferior a 10 UFC/ml. Este resultado, en conjunto con el obtenido en el ensayo del indicador, hacen que se descarte la hipótesis de crecimiento a concentraciones mayores o iguales a 467 ppm y determinando una MCI de 467 ppm.



Probablemente, la aparición de sedimento se vincule con la formación de agregados constituidos por la levadura y el AEL.

En estudios anteriores, se ha reportado una MCI del AEL de 1,13 mg/mL (equivalente a 1130 ppm) frente a *Z. bailii* mediante el método de dilución en caldo por mezcla directa del aceite con Tween® 80 (Tyagi et al., 2014). En comparación con el resultado obtenido en el presente trabajo, podría ser que al disminuir el tamaño de gota se incremente la superficie de contacto del aceite con el medio acuoso haciendo que la concentración efectiva sea menor.

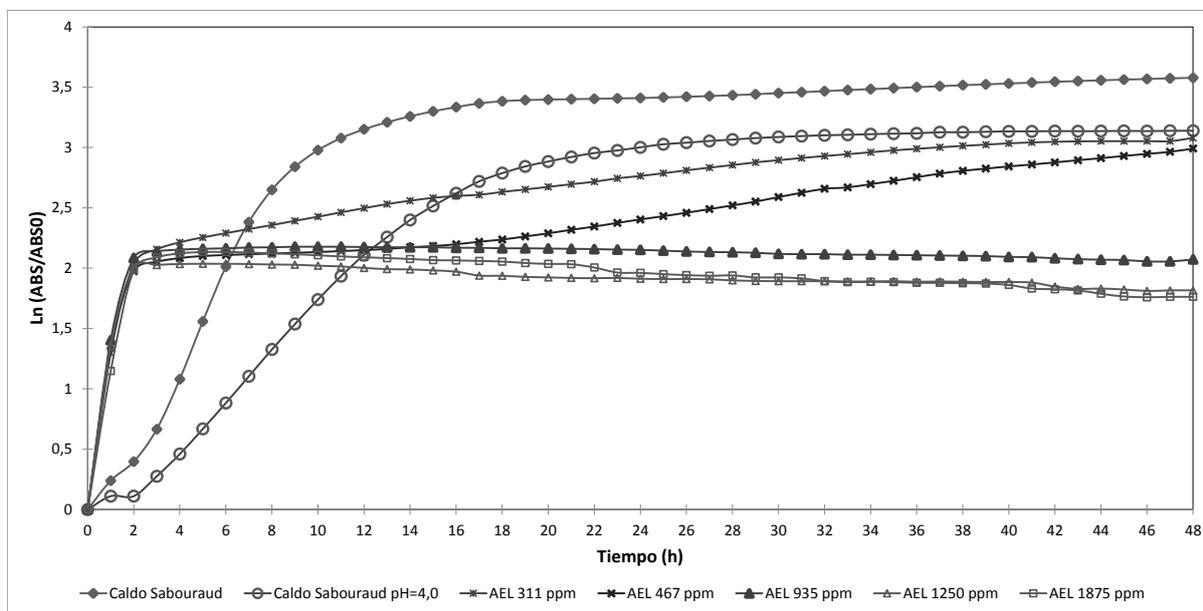


Figura 3. Curvas de crecimiento de *Z. bailii* en función del contenido de aceite esencial de lemongrass (AEL) de la nanoemulsión elaborada con 5 minutos de sonicación luego de 28 días de almacenamiento a 25°C.

Tabla 2. Recuentos (UFC/ml) de *Z. bailii* durante el almacenamiento en caldo Sabouraud en ausencia y en presencia de diferentes niveles del aceite esencial de lemongrass a pH = 4,00. (---): tiempos no evaluados.

Tiempo (h)	Caldo Sabouraud pH= 4,00	Recuentos de <i>Z. bailii</i> (UFC/ml)		
		Nivel de aceite esencial de lemongrass (ppm)		
		467	935	1875
0	$6,0 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$
2	---	$2,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^3$	< 10
3	---	$2,7 \cdot 10^5$	< 10	< 10
4	$5,8 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^4$	< 10	< 10
6	---	$6,3 \cdot 10^3$	< 10	< 10
25	$1,7 \cdot 10^7$	< 10	< 10	< 10

Evaluación del efecto del tiempo de sonicación sobre la estabilidad y la acción antimicrobiana de la nanoemulsión

El tamaño de gota disminuyó con el tiempo de almacenamiento para ambas nanoemulsiones y a partir de los 14 días de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas entre las emulsiones elaboradas a ambos tiempos de sonicación indicando que el tiempo de sonicación no afectó la estabilidad de las emulsiones (**Figura 2**). Resultados similares se han obtenido para nanoemulsiones de aceite esencial de naranja (Hashtjin, 2015). Por otra parte, la MCI obtenida fue independiente del tiempo de sonicación de la emulsión. Por lo tanto, la estabilidad y la acción antimicrobiana de la nanoemulsión fueron independientes del tiempo de sonicación.



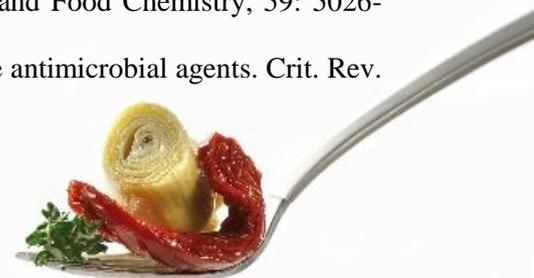
CONCLUSIONES

Se lograron elaborar nanoemulsiones estables de grado alimenticio de 12,7 y 12,3nm de diámetro de gota con aceite esencial de lemongrass y Tween 80 como surfactante, las cuales mostraron actividad antimicrobiana frente a *Z. bailii*. El tamaño de gota de las emulsiones disminuyó con el tiempo de almacenamiento. El tiempo de sonicación no afectó la estabilidad ni la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones.

Lograr una nanoemulsión de AEL estable en el tiempo permitiría su uso para preservar alimentos ya que, el hecho de que el tamaño de gota sea nanométrico hace que tenga mayor área interfacial respecto al de una emulsión de mayor tamaño de gota, por lo tanto mayor sería el área de contacto entre el antimicrobiano y la fase acuosa, donde crecen los microorganismos, permitiendo mayor acción antimicrobiana con menor concentración de aceite, minimizando efectos sensoriales en el producto final. Además permitiría prescindir del uso de conservantes sintéticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A. 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.*, 483: 220–243.
- Behrend O, K Ax, Schubert H. 2000. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* 7: 77–85.
- Buranasuksombat U, Kwon YJ, Turner M, Bhandari B. 2011. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. *Food Sci. Biotechnol.*, 20: 793–800.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223–253.
- Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. 2012. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 61: 12056-12063.
- Dima C, Dima S. 2015. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.*, 5: 29–35.
- Donsì F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT: Food Sci. Technol.*, 44: 1908-1914.
- Donsì F, Annunziata M, Vincenzi M, Ferrari G. 2012. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *J. Biotechnol.*, 159: 342-350.
- Gliemmo M, Montagnani M, Schelegueda L, González M, Campos C. 2016. Effect of xanthan gum, steviosides, clove, and cinnamon essential oils on the sensory and microbiological quality of a low sugar tomato jam. *Food Science and Technology International*, 22(2): 122-131.
- Hashtjin A, Abbasi. 2015. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocolloids*, 44: 40-48.
- Lin C, Chen L. 2008. Comparison of fuel properties and emission characteristics of two- and three-phase emulsions prepared by ultrasonically vibrating and mechanically homogenizing emulsification methods. *Fuel*, 87: 2154– 2161.
- Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44: 3057–3064.
- McClements EA, Decker JJ, Weiss. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.*, 72 (8): R109–R124.
- McClements. 2011. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *SoftMatter*, 7: 2297–2316.
- Nakabayashi K, Amemiya F, Fuchigami T, Machida K, Takeda S, Tamamitsub K, Atobe M. 2011. Highly clear and transparent nanoemulsion preparation under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification, *Chem. Commun.*, 47: 5765–5767.
- Rao J, McClements DJ. 2011. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5026-5035.
- Seow YX, Yeo CR, Chung HL, Yuk HG. 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54: 625–644.



Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Matsumoto K. 2014. A rapid microplate method for the proliferation assay of fungi and the antifungal susceptibility testing using the colorimetric microbial viability assay. *Letters in Applied Microbiology*, 59: 184–192.

Tyagi, AK, Gottardi D, Malik A, Guertzoni ME. 2014. Chemical composition, invitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT - FoodScience and Technology*, 57: 731-737.

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.



Aplicación de recubrimientos activos sobre queso: estudio de la difusión y la efectividad de natamicina
González Forte L.¹, Bértola N.², Amalvy J.^{1,3,4}

¹ Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), (CCT La Plata CONICET-UNLP), Diag. 113 y 64. La Plata, Bs. As., Argentina.

² Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CCT La Plata CONICET-UNLP), 47 y 116, La Plata, Bs. As., Argentina.

³ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). Cno. Gral. Belgrano y 526, La Plata, Bs. As., Argentina

⁴ Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Materiales (CITEMA), Facultad Regional LP (UTN) 60 y 124. La Plata, Bs. As., Argentina.

Dirección de e-mail: lucia.g.forte@gmail.com

RESUMEN

En la última edición del CICyTAC se presentó el desarrollo de películas compuestas de almidón de maíz con alcohol polivinílico (PVA) y un poliuretano (PU) sintetizado en el laboratorio con el fin de obtener películas con un 70% de almidón. En este trabajo se presentan ensayos con queso Tybo comercial tipo barra marca “Cayelac” como sistema testigo. El CAA establece que la natamicina es un conservante permitido en superficie de quesos pero no debe ser detectable a 2 mm de profundidad. Se estudió el espesor final de los recubrimientos luego de la inmersión (3 capas) de cubos de queso en las dispersiones concentradas conteniendo colorante. Luego se llevó a cabo la evaluación de la eficiencia de los recubrimientos conteniendo 1% de natamicina sobre queso Tybo almacenados a 13°C y 80% de humedad relativa. Se encontró que el recubrimiento Almidón/PVA/PU en relación 70:25:5 tuvo un efecto antifúngico sin la presencia de natamicina y que los recubrimientos con natamicina mostraron una mejora en el tiempo de conservación de un 60%. Además se estudió la difusión de natamicina hacia la masa del queso al recubrirlo con mezclas con 1% de natamicina. En todos los casos se encontró natamicina en la masa y se pudo cuantificar.

Palabras Clave: Películas activas, almidón, natamicina, queso.

ABSTRACT

In the last edition of CICyTAC the development of composite films of starch, poly(vinyl alcohol) (PVA) and a polyurethane (PU) dispersion pursuing the goal of maximizing the starch content (70 wt. %) was presented. In this work, three studies with Tybo cheese “Cayelac” are presented using the cheese as a model system. The CAA (Código Alimentario Argentino) establishes natamycin as an allowed food preservative in the surface of cheeses, but it can't be detectable at 2 mm into the cheese. The coating thickness was studied by immersion of cheese cubes in concentrated dispersions with a colouring substance (3 layers). It was also evaluated the coating efficiency with 1% natamycin on Tybo cheese stored at 13°C and 80% relative humidity. We found that the 70:25:5 coating had a protective effect even without natamycin, and that the coatings with natamycin showed an 60% improvement in the storage time. It was also found that there was diffusion of natamycin into the cheese coated with blends with 1% natamycin, and it was quantified.

Keywords: Active films, starch, natamycin, cheese.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día hay una tendencia creciente de utilizar polímeros naturales por las características de ser renovables, biocompatibles, biodegradables y en muchos casos económicamente viables. En particular los almidones provenientes de diferentes fuentes han sido empleados para elaborar recubrimientos para alimentos. Sin embargo requieren de la adición de plastificantes para reducir la rigidez y tendencia al agrietado. Una práctica común es la incorporación de glicerol o alcohol polivinílico (PVA) o combinaciones de ellos. Sin embargo la plastificación por glicerol es temporaria y puede migrar hacia el alimento. El PVA



es un polímero de amplio uso en la industria por ser no-tóxico, soluble en agua, biocompatible y biodegradable con resistencia química y propiedades físicas excelentes. La plastificación empleando PVA como único plastificante requiere de la incorporación de cantidades importantes, que supera en algunos casos el 50 % p/p. Es por esto que en este trabajo se reemplaza parte del PVA por un poliuretano de muy baja temperatura de transición vítrea, de tal manera que pueda actuar como plastificante en pequeñas cantidades o proporciones y lograr películas conteniendo como mínimo 70% p/p de almidón. Las películas obtenidas se proponen como recubrimiento para alimentos.

Todos los envases o recubrimientos plásticos, además del polímero “base”, contienen un número de otras sustancias agregadas deliberadamente durante la manufactura y procesamiento del mismo o bien de manera no-intencional en forma de residuos provenientes del proceso de polimerización. El propio polímero, al ser de alto peso molecular, inerte y con solubilidad limitada en sistemas acuosos o grasos, es difícil que se transfiera al alimento en una cantidad significativa. El interés de la “seguridad en el uso de envases/recubrimientos plásticos” radica principalmente en la posible toxicidad de otros constituyentes de bajo peso molecular presentes en el material final y que pueden migrar al producto alimenticio durante el almacenamiento.

Los procesos de migración dependen de varios factores. Además de la temperatura y del tamaño molecular de la especie que migra (migrante), la estructura química y polaridad de cada compuesto condicionan su difusión a través de la masa polimérica, razón por la cual moléculas diferentes (plastificantes y antioxidantes por ejemplo) se comportan de forma muy distinta en el mismo material y por tanto, presentan migraciones muy diferentes. También la naturaleza del polímero en el que difunden (grado de cristalinidad, densidad, etc.) influye en el proceso de migración. En consecuencia, no puede establecerse un patrón general que permita evaluar la migración específica en todas las moléculas y en todos los polímeros existentes (Nerín 2002).

Katan (1996) ha definido la *migración* como “la transferencia de masa de una fuente externa al producto envasado mediante un proceso submicroscópico”. Las consecuencias básicas de dicha migración son básicamente:

En el *envase o recubrimiento*, alteración de las propiedades físico-químicas y mecánicas del material por pérdida de componentes presentes inicialmente en el mismo.

En el *producto*, cambios en la composición, por la incorporación de sustancias “migrantes” que pueden afectar sensiblemente sus características sensoriales modificando su calidad y aceptación comercial, o que, en algunos casos, son de carácter tóxico para el organismo humano, limitando su aptitud para el consumo.

El primer aspecto puede tener algún interés tecnológico por afectar la estabilidad del envase, pero no tiene incidencia en la calidad y salubridad del alimento envasado, como sí puede tener la incorporación al mismo de componentes del material por migración (Catalá et al. 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En este trabajo se utilizó almidón de maíz comercial (Maizena Duryea®, Unilever Argentina S. A.), conteniendo 0,11g de agua, 0,006g de lípidos, 0,003g de cenizas, 0,0078 g de proteínas/g almidón, y una relación amilosa/amilopectina de 25/75 (base seca) (Ferrero et al. 1996). El alcohol polivinílico (PVA) fue utilizado en forma de polvo, con 98% de hidrólisis y un rango de peso molecular (M_w) entre 13.000 y 23.000 (Sigma Aldrich, EEUU). El poliuretano (PU) fue sintetizado a partir de 4,4'-di-isocianato de dicitlohexilmetano (H_{12} MDI, DesmodurW, Bayer) y propilenglicol, M_w 2.000 (PPG 2000, Voranol 2120, Dow) siguiendo la técnica del prepolímero (Pardini et al. 2008). También se utilizó Metanol Absoluto P.A. marca Cicarelli.

Preparación de los recubrimientos

Se gelatinizó el almidón en agua destilada al 3% p/p en un erlenmeyer de 300 ml de capacidad. Este proceso se realizó a 90°C en baño siliconado con agitación magnética durante 90 minutos con refrigerante. Por otro lado, se utilizó PVA con un grado de hidrólisis del 98%, y un peso molecular entre 13.000 y 23.000. Para obtener una solución homogénea de PVA en agua destilada se realizó una mezcla en relación 1:6 que se mantuvo durante 24 horas a 90°C en baño de aceite de silicona con agitación magnética y refrigerante.

El PU fue sintetizado en el laboratorio, obteniéndose un poliuretano H_{12} MDI con PPG 2000.

Para obtener las dispersiones formadoras de película se colocó en vaso de precipitados primero la dispersión de PU, luego la dispersión de PVA y por último el almidón gelatinizado y enfriado a temperatura ambiente.



El proceso se llevó a cabo en agitación mecánica. Para el agregado de natamicina a las dispersiones, se procedió a solubilizar la cantidad de natamicina adecuada para obtener películas al 0,1 o 1% según correspondiera en agua destilada, como parte de la cantidad correspondiente de agua que corresponde a cada formulación. La solubilización se llevó a cabo con agitación magnética durante 2 horas a 40°C, condiciones que fueron las mejores para lograr la disolución. Luego del proceso de solubilización, la mezcla natamicina-agua fue agregada a la dispersión almidón/PVA o almidón/PVA/PU gota a gota con agitación magnética, y luego de finalizado el agregado se dejó agitando durante 20 minutos para homogeneizar. Es necesario aclarar que en todos los pasos que incluían natamicina se mantuvieron las soluciones o mezclas en la oscuridad ya que la molécula es muy sensible a la luz.

Aplicación de recubrimientos activos sobre quesos

Para los ensayos con un sistema testigo se eligió un queso semi-duro Tybo comercial tipo barra marca “Cayelac” (Cayelac 2016) (**Figura 1**). La elección de este tipo de queso se hizo teniendo en cuenta que es un queso con un grado de humedad homogénea en toda su masa, que no se ve mayormente modificada con el tiempo y que, por lo tanto, nos permitió realizar los ensayos con trozos obtenidos de la barra.



Figura 1. Queso Tybo marca Cayelac, características nutricionales

Espesor de recubrimiento aplicado a queso

El estudio del espesor final de las películas luego de la aplicación por inmersión, también se realizó con queso Tybo Cayelac, cortando cubos pequeños de aproximadamente 3 x 3 x 1,5 cm. A fin de establecer una clara diferencia entre la película y la superficie del queso se utilizaron 3 colorantes que se incorporaron en forma de solución acuosa concentrada, a saber: negro de eriocromo T, fucsina básica y cristal violeta.

Se prepararon las dispersiones correspondientes a las mezclas 70:30, 70:25:5 y 70:15:15 de la forma descrita anteriormente. A continuación se agregó la solución del colorante concentrado (5 gotas de cada uno a cada mezcla). Luego las dispersiones se concentraron en baño a 75°C con agitación mecánica hasta eliminar aproximadamente el 6% de su peso inicial. En estas condiciones las dispersiones presentaron una mayor viscosidad sin grumos, lo cual facilitó el proceso de incorporación por capas sobre el queso.



Se realizaron capas sucesivas por inmersión de los cubos de queso en las dispersiones concentradas. Luego de cada inmersión se dejó escurrir el exceso, y se colocó cada cubo sobre una placa siliconada. La placa se llevó a estufa de tiro forzado a 30°C y se hicieron volteos de los cubos cada 10-15 minutos para que todas las caras se secaran. Este proceso se repitió hasta lograr cubrir todos los cubos con tres capas.

Posteriormente, se realizó un corte “limpio” a los cubos de queso para poder visualizar la capa de colorante. Por último se utilizó una lupa con aumento 10X, escala milimetrada y luz directa para fotografiar los límites de color. Para determinar el espesor se utilizó el software Image-Pro Plus.

Ensayo de difusión de natamicina

El Código Alimentario Argentino (CAA) establece que la natamicina es un conservante permitido en superficie de quesos de muy alta, alta, mediana y baja humedad, y no debe ser detectable a 2 mm de profundidad desde la “cáscara”, además que debe estar ausente en la masa (CAA 2014a, CAA 2014b).

Para llevar a cabo este ensayo, se prepararon dispersiones de almidón/PVA/PU en proporciones 70:30, 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15, todas conteniendo 1% natamicina, siguiendo las etapas previamente explicadas. Luego del agregado de todos los componentes, incluida la natamicina solubilizada en agua de la misma forma antes expuesta, se procedió a concentrar las mezclas por evaporación a 70°C en baño con agitación mecánica, hasta lograr una pérdida de aproximadamente 28% p/p. Luego las soluciones se llevaron a temperatura ambiente con agitación magnética en baño de agua.

Para esta experiencia se utilizó queso Tybo marca Cayelac, el cual fue cortado en cubos de 3 cm x 3 cm x 3 cm. Se procedió a sumergir los cubos de queso en las mezclas correspondientes, dejando escurrir el exceso para luego colocarlos sobre una placa siliconada que fue llevada a una estufa de tiro forzado a 30°C. Cada 15 minutos se realizaron volteos de los cubos para asegurar que todas las caras logran secarse. Este proceso se llevó a cabo repetidamente hasta cubrir los cubos con 3 capas, proceso que llevó un total de dos horas aproximadamente. Para cada muestra se realizaron triplicados.

Los cubos recubiertos fueron colocados de manera individual en bolsas plásticas para quesos y termoselladas al vacío con un equipo “Food Saver”, y luego se colocaron en cámara a 10°C durante 75 días. El objetivo fue permitir la difusión de natamicina al interior del queso (si esto ocurriera), durante un período de tiempo equivalente al de la maduración y distribución de un queso semiduro, que oscila entre los 60 y los 90 días, dependiendo del tamaño del queso.

Para determinar si la natamicina difundió y logró penetrar más de 2 mm de profundidad en la masa del queso, se procedió según la técnica de De Ruig et al. (1987) que se corresponde parcialmente con la norma ISO 9233 (2013), también utilizada por Vierikova et al. (2015).

En primera instancia se procedió a remover la parte exterior de los cubos de quesos a 2 mm de profundidad, y luego se cortó el remanente en piezas de 0,5 cm² y se mezclaron para homogeneizar la masa. Luego se pesaron 5 ± 0,01 g de muestra y se colocaron en un erlenmeyer de 100 mL. Se agregaron 50 mL de metanol puro (MeOH) y se mantuvo con agitación magnética durante 90 min, para después agregar 25 mL de agua destilada. Para precipitar las grasas, se colocó el erlenmeyer en freezer a -18°C, y se dejó durante una hora. Se procedió a filtrar el extracto frío con embudo Buchner y kitasato, utilizando un papel Whatman N° 3, y se descartaron los primeros 5 mL. El extracto se llevó a temperatura ambiente, y luego se filtró con un filtro para jeringa con filtro de nylon de 0,45 µm. Por último se filtró a través de un filtro de 0,2 µm tipo FG con jeringa de vidrio.

Para la determinación espectrométrica se hicieron medidas entre 200 y 800 nm, utilizando como blanco una solución MeOH:H₂O en relación 2:1. Se midió la absorbancia del mínimo a 311,5 nm, y de los máximos a 318 y 329 nm, bandas de absorción características de la natamicina.

Para las curvas de calibración correspondientes se utilizó una solución madre de 37,5 ppm de natamicina en MeOH:H₂O en relación 2:1, y se realizaron diluciones sucesivas.

Ensayo de conservación de queso en condiciones de maduración

Para llevar a cabo este ensayo, se prepararon dispersiones de almidón/PVA/PU en proporciones 70:30, 70:25:5 y 70:15:15, y mezclas 70:30 y 70:25:5 conteniendo 1% de natamicina, siguiendo las etapas previamente descritas. Luego, se procedió a concentrar las mezclas por evaporación a 70°C en baño con agitación mecánica, hasta lograr una pérdida de peso de aproximadamente 28%. Las soluciones obtenidas se llevaron a temperatura ambiente con agitación magnética en baño de agua y se realizó el agregado de la solución de natamicina en los casos correspondientes. También para este estudio en todos los pasos que incluían natamicina se mantuvieron las soluciones o mezclas en la oscuridad.

Para esta experiencia se utilizó queso Tybo marca Cayelac, el cual fue cortado en trozos de 5 cm x 6 cm x 2 cm. Se procedió a sumergir los cubos de queso en las mezclas correspondientes, dejando escurrir el exceso



para luego colocarlos sobre una placa siliconada que fue llevada a una estufa de tiro forzado a 30°C. Cada 20 minutos se realizaron volteos de los cubos para asegurar que todas las caras logran secarse. Este proceso se llevó a cabo repetidamente hasta cubrir los cubos con 3 capas. Para cada muestra se realizaron duplicados. Los cubos recubiertos se colocaron en un ambiente controlado con aproximadamente 82% de humedad relativa y 13°C, condiciones correspondientes a la maduración de este tipo de quesos, y se realizó un seguimiento fotográfico diario de la superficie, para evaluar aparición y proliferación de mohos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espesor de película

Para la determinación del espesor de las películas, se trabajó en esta instancia con los quesos cubiertos con mezclas conteniendo cristal violeta ya que fue el que mostró límites más definidos y con menos difusión hacia el interior del queso. Por otro lado, la solución de negro de eriocromo T se desestabilizó al cubrir los quesos (indicado en la figura con un círculo), por lo que se decidió descartar estas muestras. Estos resultados se pueden observar en la **Figura 2**. También es importante resaltar que se intentó completar las capas sucesivas mediante aplicación con pincel (pintado) pero no resultó eficiente, por lo que finalmente se decidió hacerlo por inmersión de los cubos de queso en las dispersiones concentradas.



Figura 2. Fotografías de trozos de quesos recubiertos con películas dopadas con diferentes colorantes

Se llevaron a cabo las mediciones del espesor del recubrimiento obteniéndose un espesor promedio de 50 μm como resultado de tres capas sucesivas por inmersión, lo cual resultó similar al espesor de película que se obtuvo por *casting* para las películas que se estudiaron con técnicas de caracterización de materiales. Por este motivo, se decidió trabajar para los ensayos aplicados sobre la superficie de queso con tres capas de dispersión polimérica concentrada sucesivas por inmersión. En la **Figura 3** se muestran imágenes de los cubos de queso recubiertos con solución de cristal violeta y cómo se veía el límite del recubrimiento al realizar un corte.



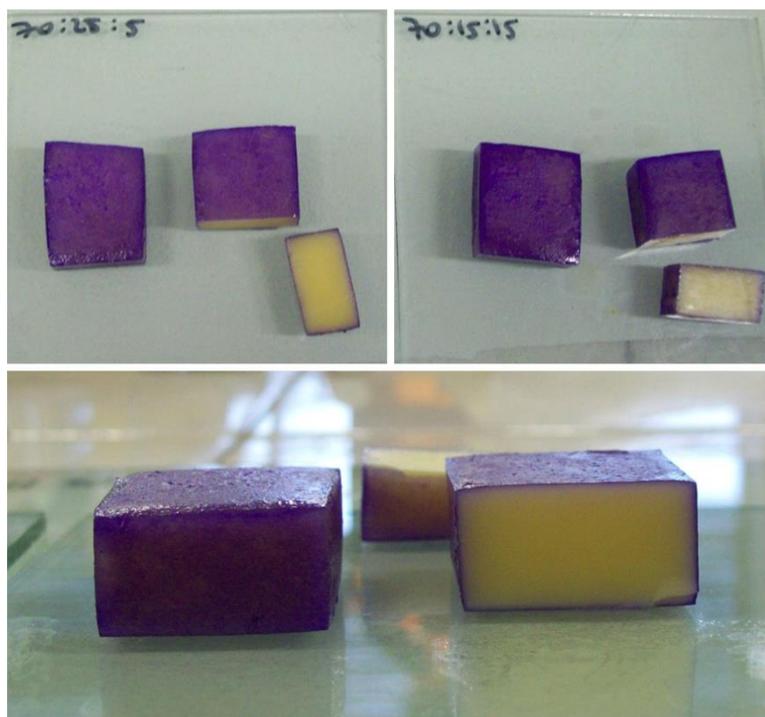


Figura 3. Cubos de queso Tybo recubiertos con dispersión polimérica con colorante cristal violeta y corte de los mismos para medir espesor del recubrimiento aplicado.

Ensayo de difusión de natamicina

De Ruig et al. (1987) plantearon la posibilidad de, luego de obtener el extracto del queso, estudiar la presencia de natamicina por vía espectrométrica con rayos UV, mientras que la norma ISO 9233 (2013) y Vierikova et al. (2015) propusieron como alternativa de mayor sensibilidad concentrar los extractos y estudiarlos por HPLC-espectroscopia de masa acoplados. Para nuestro objetivo, la sensibilidad de la técnica con espectrometría UV fue adecuada ya que se trabajó con un límite de detección de 0,5 mg natamicina/kg queso.

Previamente, se realizaron las curvas de calibración correspondientes al mínimo de absorbancia a 311,5 nm, y también para los máximos a 318 y 329 nm, eligiéndose como mejores ajustes las curvas para 311,5 y 329 nm.

Para obtener el “blanco” se utilizó una solución de MeOH:H₂O en relación 2:1. Previamente se llevó a cabo la corroboración de que esta solución era un “buen blanco”, ya que se realizó el procedimiento de un extracto para un queso sin recubrimiento, y el espectro obtenido fue igual al de la solución MeOH:H₂O.

En la **Figura 4** se muestran los resultados obtenidos para el contenido de natamicina en la masa del queso luego de eliminar los 2 mm superficiales de cubos de queso recubiertos con mezclas concentradas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 conteniendo 1% de natamicina.



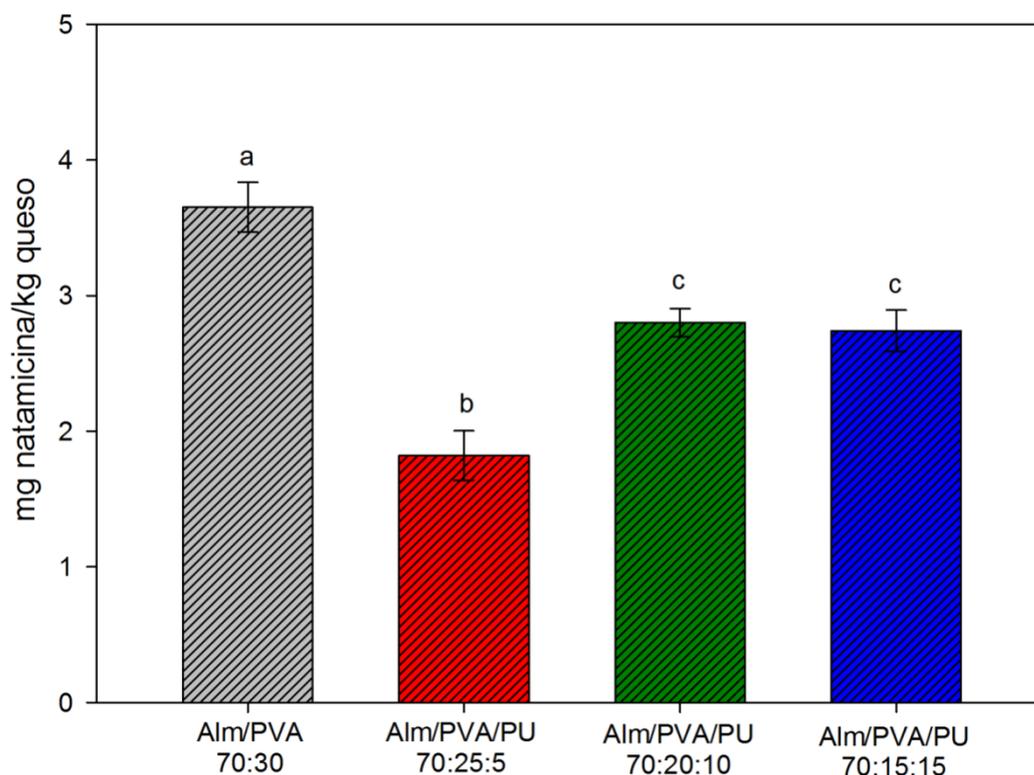


Figura 4. Contenido de natamicina en la masa del queso expresado como mg de natamicina/kg de queso para cubos de queso recubiertos con mezclas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 aditivados con 1% de natamicina.

En todos los casos se encontró natamicina en la masa y se pudo cuantificar. Los recubrimientos de Alm/PVA/PU mostraron menor liberación de natamicina que la mezcla Alm/PVA. Dentro de las mezclas ternarias, la que mostró menor difusión de natamicina fue la 70:25:5.

Ensayo de conservación de queso en condiciones de maduración

El ensayo de conservación de queso se llevó a cabo utilizando las siguientes muestras (**Figura 5**):

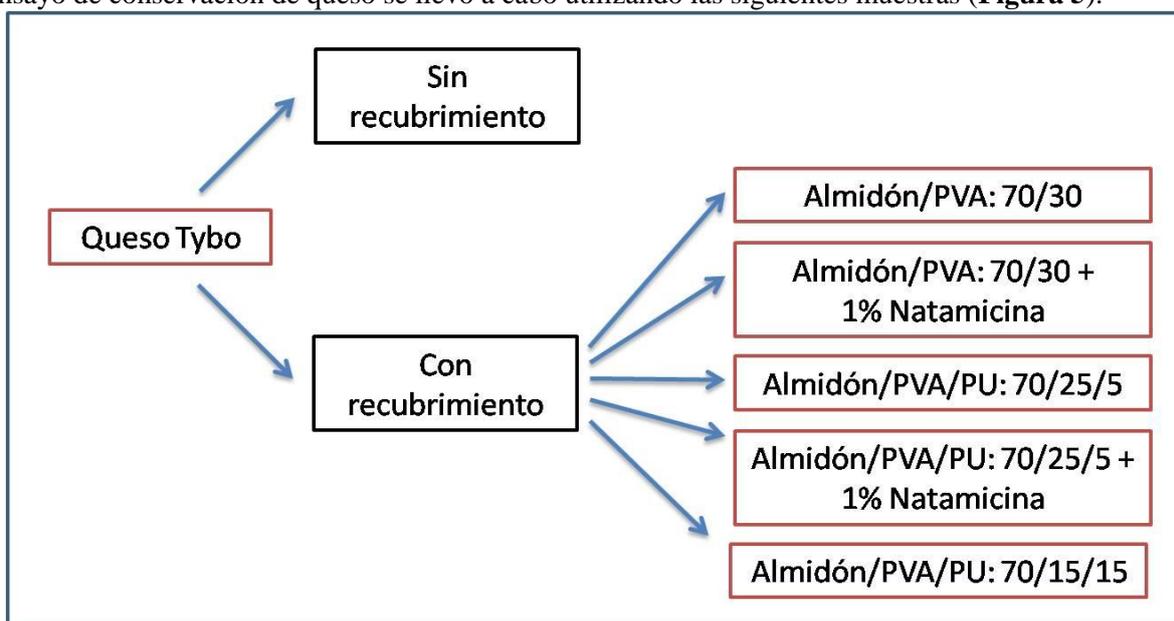


Figura 5. Esquema de trabajo para el ensayo de conservación con cubos de queso con recubrimiento.



En las **Figuras 6** y **7** se muestran fotos de los cubos de queso sin recubrimiento, y con recubrimientos Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:15:15, Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU: 70:25:5 con 1% de natamicina, todas al día 0 (izquierda) y al día 6 del ensayo (derecha).



Figura 6. Quesos control sin recubrimiento y quesos con recubrimiento Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:15:15 al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de seis días de almacenamiento (derecha).



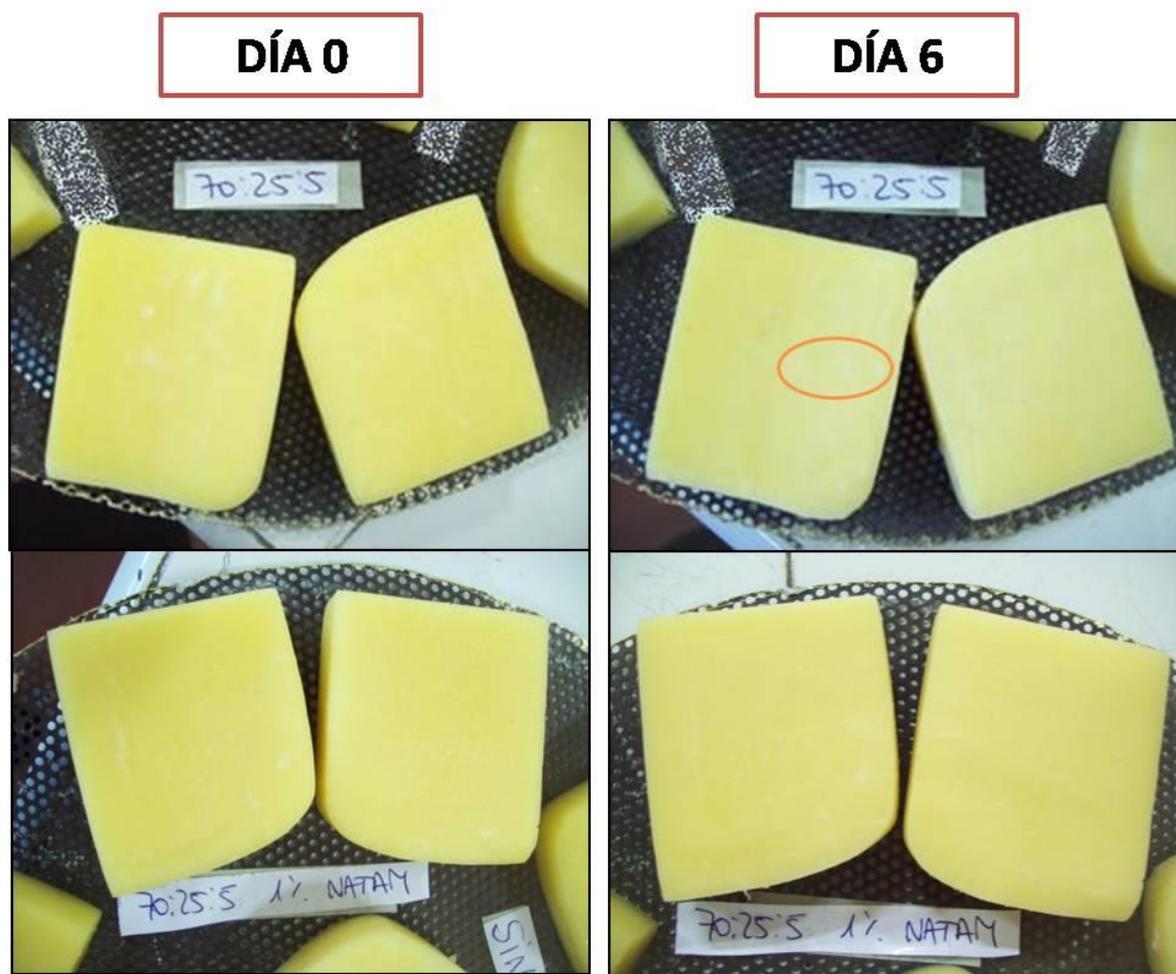


Figura 7. Quesos con recubrimiento Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU: 70:25:5 con 1% de natamicina al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de seis días de almacenamiento (derecha).

Los quesos con recubrimiento de Alm/PVA/PU 70:25:5 y 70:15:15 mostraron un efecto antifúngico/fungistático incluso sin la presencia de natamicina, ya que el crecimiento fue menor que para los quesos recubiertos con formulación Alm/PVA 70:30 y que para el Control sin recubrimiento. También se pudo observar que los quesos con recubrimiento de almidón y PVA 70:30 mostraron un mayor crecimiento de hongos en la superficie que aquellos quesos que no tenían recubrimiento (control). Esto puede deberse a que ambos componentes de la mezcla resultan sustratos atractivos para los microorganismos.

En la **Figura 7** podemos ver que cuando incorporamos natamicina, el efecto antifúngico es completo aún al día 6. En estos quesos con natamicina se observó la aparición de hongos al día 8 de almacenamiento, y éstos fueron de crecimiento más lento. Los recubrimientos con natamicina al 1% mostraron una mejora en el tiempo de conservación de aproximadamente un 60%, ya que sin natamicina al día 5 se pudo observar desarrollo microbiano, mientras que con natamicina presente recién al día 8 se detectó crecimiento fúngico.



CONCLUSIONES

Luego de los ensayos realizados se concluyó que el espesor promedio de los recubrimientos fue de 50 μm , como resultado de tres capas sucesivas por inmersión, el cual resultó similar al espesor de película que se obtuvo por *casting* para las películas que se estudiaron con técnicas de caracterización de materiales. Por otra parte, los recubrimientos con natamicina al 1% sobre queso mostraron una mejora en el tiempo de conservación de aproximadamente un 60%.

Por último, al estudiar la difusión de natamicina hacia la masa del queso cuando se lo recubrió con mezclas cargadas al 1%, se encontró que en todos los casos hay presencia del antifúngico en la masa del queso y que se puede cuantificar. Esto último no cumple con lo expuesto en el CAA, y es por este motivo que se considera trabajar en el futuro con 0,1% de natamicina para cumplir con la cantidad permitida de 1 mg/dm^2 por unidad de superficie por el CAA.

BIBLIOGRAFÍA

- CAA. 2014a. Alimentos Lácteos. En: ANMAT, editores. Código Alimentario Argentino: Art. 553 a 642.
- CAA. 2014b. Aditivos Alimentarios. En: ANMAT, editores. Código Alimentario Argentino. XVIII: Art. 1391 a 1406.
- Catalá R, Gavara R. 2002. Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos. Valencia: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos: 346.
- Cayelac. 2016. Queso Tybo. El día 25-07- 2016, de www.cayelac.com.ar.
- de Ruig WG, van Oostrom JJ, Leenheer K. 1987. Spectrometric and Liquid Chromatographic Determination of Natamycin in Cheese and Cheese Rind. Journal - Association of Official Analytical Chemists, 70: 944-948.
- Ferrero C, Martino MN, Zaritzky NE. 1996. Effect of hydrocolloids on starch thermal transitions, as measured by DSC. J. Therm. Anal., 47: 1247-1266.
- ISO. 2013. Cheese, cheese rind and processed cheese - Determination of natamycin content. . Part 2: High - Performance Liquid Chromatographic method for cheese, cheese rind and processed cheese. Geneva, International Organization for Standardization. 9233-2.
- Katan LL. 1996. Migration from food contact materials. London: Blackie Academic and Professional: 303.
- Nerín C. 2002. Migración en poliolefinas. En: R Catalá, Gavara R, editores. Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos. Valencia: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.
- Pardini OR, Amalvy JI. 2008. FTIR, $^1\text{H-NMR}$ spectra, and thermal characterization of water-based polyurethane/acrylic hybrids. J. Appl. Polym. Sci., 107: 1207-1214.
- Vierikova M, Hrnčiarikova E, Lehotay J. 2015. Determination of natamycin content in cheese using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 36: 2933-2943.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la CIC, CONICET y a la ANPCyT (PICT 2011- 0238) por el apoyo económico.



Películas compuestas a base de pectina: efecto del tamaño de la fibra de zanahoria sobre la estabilidad del ácido ascórbico

Idrovo Encalada A., Basanta M.F., Fissore E.N., De'Nobili M.D., Rojas A.M.

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias, Argentina idrovoalondra@gmail.com

RESUMEN

Las fibras obtenidas de los residuos del procesamiento de la zanahoria (*Daucus carota*), esencialmente constituidas por los polisacáridos de la pared celular son co-extraídas con antioxidantes naturales asociados. Las películas comestibles compuestas (PCC) constituyen una estrategia para la preservación antioxidante de alimentos. Dado que las propiedades de hidratación de la fibra extraída de la zanahoria (FZ) en un trabajo previo, aumentaron con el tamaño de partícula (53, 105 y 210 micrones), en este trabajo se analizó la influencia del tamaño de partícula sobre la estabilidad del ácido L-(+)-ascórbico (AA) soportado en la PCC. Se elaboraron cuatro sistemas a base de pectina de bajo metoxilo (LMP) entrecruzada con Ca²⁺. A tres de ellos se les agregó FZ, y el cuarto sistema fue sin fibra (control, Ca-LMP). Se determinó cierta actividad antioxidante en las PCC (≈6 mg AA/100 g película). Cuando se cargó también AA, su estabilidad a la hidrólisis (25.0°C; 57,7% humedad relativa, HR) aumentó con la disminución del tamaño medio de partícula, mostrando la menor estabilidad en Ca-LMP, sin fibra (0%-FZ), y en las PCC con fibra de 210 μm. El AA actuó como un sensor de la disponibilidad del agua adsorbida en la matriz polimérica equilibrada a 57,7% HR.

Palabras clave: fibra de zanahoria, tamaño de partícula, películas comestibles compuestas, estabilidad del ácido ascórbico.

ABSTRACT

Fibers obtained from the residues of the harvest and industrialization of carrot (*Daucus carota*), essentially constituted by the cell wall polysaccharides, are co-extracted with natural antioxidants associated. Composite edible films (CEF) constitute a strategy for antioxidant food preservation. Since the hydration capacity of the carrot fiber (CF) determined in a previous work increased with the particle size (53, 105 y 210 microns), the influence of it on the hydrolytic stability of the L-(+)-ascorbic acid (AA) loaded in the CEF was studied in the present work. Four systems of CEF based on low methoxyl pectin (LMP) cross-linked with Ca²⁺ were developed. Three of them were loaded with CF, whereas a fourth system without fiber (control, Ca-LMP) was also developed. Some antioxidant activity was determined in composites (≈6 mg AA / 100g film). When AA was also loaded in films, its hydrolytic stability (25.0°C; 57.7% relative humidity, RH) increased when the average particle size decreased, showing the lowest stability in Ca-LMP film developed without CF (0%-fiber), and in 210μm-CF-LMP film as well. The AA behaved as a sensor of the water availability into the film network equilibrated at 57.7%-RH.

Keywords: carrot fiber, average particle size, composite edible films, ascorbic acid stability.

INTRODUCCION

La demanda actual de alimentos frescos y fáciles de preparar ha traído consigo el desarrollo de nuevas metodologías de preservación, a fin de obtener alimentos inocuos y mejorados en sus características nutricionales y organolépticas. Entre las tecnologías emergentes para la optimización de la preservación de alimentos, surge como alternativa el empleo de películas o de recubrimientos comestibles que puedan impartir propiedades funcionales específicas al alimento. Por otra parte, los problemas de contaminación del medio ambiente, originados por el desecho y la acumulación de materiales de empaque de origen sintético como los plásticos producidos a partir de derivados del petróleo, han incrementado el interés por el desarrollo de películas y/o recubrimientos elaborados a partir de polímeros biodegradables que presenten propiedades mecánicas y de barrera similares a las de los plásticos sintéticos.

Una “película” (*film*) es una capa preformada que se autosoporta, la cual es utilizada para envolver el



producto (Guilbert, 1986). Su utilización supone una alternativa prometedora en el campo de la conservación de alimentos, posibilitando la disminución de residuos plásticos. Adicionalmente, estos recubrimientos ofrecen la posibilidad de incorporar aditivos de interés, tales como aromas, agentes antimicrobianos o antifúngicos y antioxidantes (Baldwin *et al.* 1996).

Para la formulación de las películas comestibles se deben emplear biopolímeros (ej. almidones, derivados de celulosa, quitosano, gomas, proteínas del suero láctico, concentrados de proteína de soja). Además, pueden agregarse grasas y aceites para buscar propiedades específicas (Chillo *et al.*, 2008; Phan *et al.* 2009). En general, se hace indispensable el uso de moléculas pequeñas compatibles con el biopolímero formador de estructura, para que actúen como plastificantes (ej. polioles como glicerol, sorbitol), a fin de proporcionar la flexibilidad y extensibilidad deseada a dichas películas (Fernández Cervera *et al.* 2004). El sorbato de potasio es uno de los antimicrobianos más comúnmente empleados en la industria alimentaria. Posee acción contra hongos, levaduras y algunas bacterias a pH menor a 6. La incorporación de sorbato de potasio a la formulación de películas comestibles ha sido propuesta como modo de disminuir su deterioro superficial por contaminación microbiana (Cagri *et al.* 2001; Flores *et al.* 2007a, 2007b)

La adición de componentes con actividad antioxidante puede mejorar las propiedades funcionales de las películas comestibles y aumentar sus usos potenciales para la preservación de alimentos con importante contenido graso, modificar las propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno de los films, además de obtenerse ventajas adicionales como la protección frente a la oxidación lipídica (Gutiérrez *et al.* 2008; Han *et al.* 2008).

Los objetivos del presente trabajo fueron desarrollar PCC antioxidantes portadoras de AA, elaboradas a base de pectina de bajo metoxilo entrecruzadas con Ca^{2+} y con el agregado de fibra aislada de zanahoria (FZ), portadora de antioxidantes co-extraídos, con tamaños medio de partícula de 53, 105 y 210 μm respectivamente, y determinar la influencia del tamaño de partícula de la fibra sobre la estabilidad hidrolítica del AA, considerando que la capacidad de hidratación de las partículas disminuía con el tamaño de partícula, según lo determinado en un trabajo previo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fabricación de las películas

La FZ (0,4000 g) de un tamaño dado de partícula fue agregada a 30,00 mL de agua desionizada, agitada y dejada equilibrar durante 18h a 25°C, para ser incorporada luego, en su totalidad (fibra y agua) a la solución formadora de película correspondiente. Se elaboraron cuatro sistemas de películas. A tres de estas formulaciones se les incorporó la FZ hidratada, con tamaño medio de partícula de 53, 105 ó 210 μm . La cuarta formulación fue desarrollada sin el agregado de fibra.

Para la fabricación de las películas, se pesaron 8,00g de pectina de bajo metoxilo (LMP) comercial (GENU™ tipo LM-12CG), y se la dispersó en $\approx 250,00$ g de agua desionizada contenida en un vaso de precipitados de 1 L de capacidad. La solución obtenida fue continuamente agitada a 1400 rpm constantes con un agitador vertical de velocidad (rpm) controlada (Modelo LH, Velp Scientifica, Italia). A continuación, y mientras se continuaba agitando, la solución fue calentada sobre un plato calefactor (Velp, Scientifica, Italia). Se fue midiendo la temperatura de la solución utilizando una termocupla conectada a un milivoltímetro (Consort P 901, Bélgica). Cuando la temperatura de la solución alcanzó los 90°C, se agregaron 4,00 g de glicerol para la plastificación (76,2 g/100g LMP), sorbato de potasio (0,030g/100g de solución) como agente antimicrobiano, y AA (0,100g/100g de solución). Cuando la temperatura alcanzó nuevamente los 90°C, se agregó la suspensión acuosa de fibra hidratada de zanahoria (7,6 g/100g LMP) y finalmente, 0,500g de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) disuelto en 2mL de agua desionizada. A continuación se retiró el vaso de precipitados de la plataforma calefactora y se completó el peso total de la solución a 300,00 g en una balanza granataria por medio del agregado de suficiente cantidad de agua desionizada. Se dispensó la solución en caliente, distribuyéndola entre placas de Petri de poliestireno de 55 mm de diámetro (9 g solución/placa). Se pesó con precisión la cantidad de solución dispensada en cada placa usando balanza analítica (0,0001 g precisión), identificando la placa, de manera de conocer el contenido de AA de la película obtenida en función de la masa de solución dispensada en la placa correspondiente [called “*peso_{AA(o,loaded)}*”]; Ecuación (1)]. Se las dejó enfriar para que la solución contenida en cada placa gelificara. A continuación fueron sometidas a secado en estufa con convección forzada de aire a velocidad constante y a 60,0°C durante 3 horas. Luego, se las dejó enfriar a temperatura ambiente. Las películas fueron desprendidas de las respectivas placas y almacenadas al abrigo de la luz y en ausencia de aire (al vacío) en



deseCADORES de 26 cm de diámetro (Nalgene, EEUU), con humedad relativa controlada (HR=57,7%) debida a una solución saturada de NaBr colocada en la parte inferior del desecador. Todos los desecadores, con cada sistema y condición, fueron almacenados en una cámara a temperatura constante de $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Velp, Italia). Se fabricaron 3 lotes de cada formulación para reunir suficiente número de películas y para tener un triplicado experimental de cada una. A distintos tiempos de almacenamiento se retiraba una película de cada uno de los 3 lotes fabricados para un dado sistema o formulación. A cada tiempo se contaba así, para un sistema dado, con tres películas provenientes de tres fabricaciones (lotes identificados) diferentes, sobre cada una de las cuales se determinaba el contenido de AA [$C_{AA}(t)$] (triplicado) según lo reportado por De'Nobili y *et al.* (2013b), calculando el contenido de AA a tiempo inicial ($t=0$) así como a distintos tiempos (t) durante el almacenamiento:

$$C_{AA}(t) = \frac{\text{peso}_{AA}(t)}{\text{peso}_{AA, \text{film}}(Q, \text{cargado})} \quad (1)$$

$$\text{donde, } C_{AA}(t=0) = \frac{\text{peso}_{AA}(0)}{\text{peso}_{AA, \text{film}}(Q, \text{cargado})} = 1.00 \quad (2)$$

Determinación del contenido de ácido L-(+)-ascórbico

Cada película fue cortada en trozos muy pequeños y colocada en un tubo graduado de 50,0 mL con tapa. Se agregaron 25,00 ml de solución de ácido oxálico (1% p/v). Cada tubo fue sometido a agitación durante 90 segundos en vórtex (Velp, Italia). Después de cada agitación los tubos fueron guardados en refrigeración por 15 minutos. Este procedimiento se realizó cuatro veces. A continuación, la suspensión fue centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos, a $6,0^\circ\text{C}$ (centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania). Se determinó la concentración de AA mediante el método espectrofotométrico del 2,6-diclorofenol indofenol (De'Nobili *et al.* 2013b). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Cada determinación se realizó por duplicado sobre cada extracción con agua de una película determinada. El contenido de AA se calculó según la ecuación (1).

Análisis de resultados

Los resultados fueron reportados como el promedio y la desviación estándar (DS) de n replicados de cada muestra, luego de analizados a través del ANOVA (nivel de significación $\alpha=0,05$), seguido de comparación múltiple evaluada a través de un test de mínimas diferencias significativas, usando el programa Statgraphicpackage (Statgraphic Plus for Windows, version 5.0, 2001, USA).

La constante de velocidad de hidrólisis (k_{AA}') fue calculada por regresión lineal de acuerdo a una reacción de primer orden, donde la concentración de AA remanente a tiempo t [$C_{AA}(t)$] fue calculada de acuerdo a la Ecuación 2. El análisis de covarianza (ANCOVA) fue aplicado para comparar las pendientes y por lo tanto, las constantes de velocidad (k_{AA}'), tal como fuera indicado por Sokal y Rohlf (2000). El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue calculado de acuerdo a una cinética de orden uno y un coeficiente estequiométrico de reacción $\nu_1 = 1$ para el AA:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{AA}'} \quad (3)$$



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elaboración de películas

Se fabricaron por triplicado, cuatro sistemas de películas comestibles a base de pectina de bajo metoxilo (LMP), uno sin y tres con el agregado de fibras aisladas de zanahoria (7,6g/100 g de pectina), ya sea con tamaños de partícula promedio de 53, 105 ó 210 μm . La gelificación de la solución formadora de película ocurrió en presencia de iones de calcio ($6,48 \times 10^{-4}$ moles de Ca^{2+} /g de LMP), durante el enfriamiento en cada placa donde fuera dispensada. Se utilizó glicerol para la plastificación (76,2g/100g de LMP). La concentración de fibra se seleccionó en base a ensayos anteriores, de manera de obtener películas con importante contenido de fibra, pero que fueran convenientemente flexibles.

Previo al agregado de AA, las películas compuestas fueron las que mostraron actividad reductora (ensayo de FRAP) tal como se reporta en la **Tabla 1**. Adicionalmente, a todos los sistemas desarrollados se les agregó AA a los fines de obtener películas antioxidantes. Las fibras vegetales, en este caso de la zanahoria, podrían constituir la forma natural o matriz polimérica que mantiene estables a los antioxidantes naturales co-extraídos (ej. compuestos fenólicos, β -caroteno) responsables de la actividad reductora reportada en la **Tabla 1**. El AA cargado en las películas podría en parte contribuir también a preservar al β -caroteno de la degradación foto-oxidativa esto es, del blanqueo de la fibra debido a la luz o, en sistemas lipídicos, debido a la reacción con los RL producidos durante la autooxidación de los lípidos (Gordon, 2001).

Las películas sin fibra (LMP sola) y las películas compuestas a base de LMP, se equilibraron por almacenamiento a temperatura (25,0°C) y humedad relativa (57,7%) (Ec. 2) constantes (habiendo alcanzado el equilibrio con el medio ambiente a las 48h (películas LMP) y a los 6,5 días (películas compuestas).

Retención del ácido L-(+)-ascórbico y movilidad del agua en las películas

La actividad antioxidante determinada en las películas desarrolladas sin el agregado de AA, se informa en la **Tabla 1**. No se detectó capacidad de captura de RL, pero sí se observó algún nivel de capacidad reductora (ensayo de FRAP) por parte de las películas compuestas.

Tabla 1. Capacidad antioxidante^{1,2,3} de las películas desarrolladas sin el agregado de ácido L-(+)-ascórbico (AA), evaluada mediante su capacidad de captura de radicales libres (ensayo de DPPH) y su actividad reductora (ensayo de FRAP).

	Película LMP	Películas compuestas		
		Tamaño medio de partícula (μm)		
		53	105	210
DPPH (mg AA/100 película)	ND	ND	ND	ND
FRAP (mg AA/100 g película)	ND	7.1 ± 0.9^A	5.3 ± 0.2^B	6 ± 1^{AB}

¹Se reporta la media y el desvío estándar ($n > 3$).

²Letras mayúsculas diferentes como supraíndice en una misma fila indica que existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

³La actividad antioxidante se informa en base a una curva de calibración realizada con AA.

ND: no detectable.

La actividad antioxidante de las películas ahora cargadas con AA depende en parte del tiempo de vida media del AA en las mismas. En ausencia de oxígeno, el AA se degrada por hidrólisis (León y Rojas, 2007). A 57,7% de HR ambiente de equilibrio, el disponible en la matriz polimérica de las películas equilibradas esto es, menos retenida por la matriz polimérica, es agua disponible para reaccionar (Labuza *et al.* 1972). Además, como es agua “no solvente”, resulta ser muy reactiva inclusive como nucleófilo en la hidrólisis, por ejemplo, del AA soportado en la película (León y Rojas, 2007). Por lo tanto, la estabilidad del AA dependería del grado de inmovilización del agua por la matriz polimérica. El AA presente en las películas equilibradas a 57,7% de HR puede entonces también actuar como un sensor del grado de disponibilidad del agua en la matriz (León y Rojas, 2007). Se analizó entonces si la estabilidad de AA durante el almacenamiento en ausencia de aire, a temperatura (25,0°C) y humedad relativa (57,7%) constantes, fue influenciada por el tamaño de partícula usado para el desarrollo de las películas compuestas. Las representaciones gráficas de la caída de la concentración del AA en función del tiempo [$C_{AA}(t)$; ecuación 1] se muestran en la **Figura 1**. En las mismas se observa la dependencia lineal, en escala semi-logarítmica,



acorde con una cinética de pseudo-primer orden desde $t = 0$ de almacenamiento de las películas. El ajuste de los datos experimentales ($p < 0.05$) correspondió entonces a esta cinética, tal como fuera previamente reportado en bibliografía para el AA (Lee y Labuza, 1975; Lee *et al.* 1977; Riemer y Karel, 1978; Saguy *et al.* 1978; Esteve *et al.* 1999; Rojas y Gerschenson, 2001; León y Rojas, 2007).

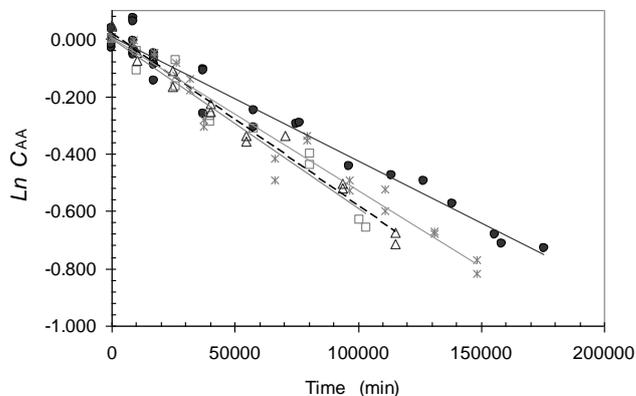


Figura 1. Cinética de degradación del ácido L-(+)-ascórbico en las películas almacenadas a 25,0°C y 57,7% de humedad relativa, en ausencia de aire. Se muestran los puntos experimentales correspondientes a las películas desarrolladas con fibra de zanahoria de tamaños medios de partícula de 53 (●), 105 (*) y 210 μm (--△--), así como a la película sin fibra (□). Las líneas continuas corresponden al ajuste de la cinética de orden uno.

Para que se inicie la degradación del AA es necesaria la hidrólisis irreversible de su anillo de lactona (**Figura 2**) como primer paso de la reacción (Kurata y Sakurai 1967). León y Rojas (2007) propusieron que las moléculas de agua podrían estar involucradas, a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) en la reacción inicial de destrucción del AA en condiciones anaeróbicas. Esta reacción lleva a la hidrólisis del anillo lactónico del AA, el cual se transforma en ácido 2-ceto-L-gulónico (KGA), a través de una reacción catalizada por los protones (H^+) del medio ácido (Kurata y Sakurai, 1967).

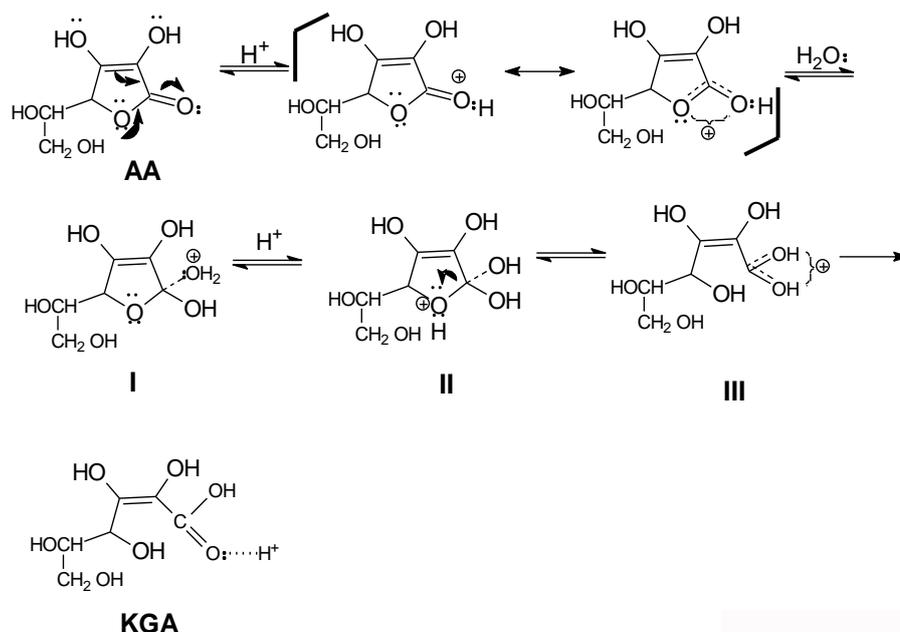
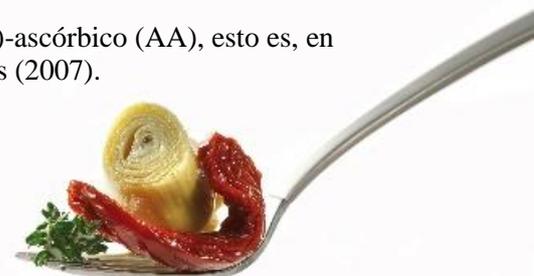


Fig. 2. Mecanismo de reacción de degradación hidrolítica del ácido L-(+)-ascórbico (AA), esto es, en condiciones anaeróbicas, propuesto por León y Rojas (2007).



El ataque del anillo de lactona del AA por una molécula de agua (S_N2) también se sugirió que sería lo suficientemente lento como para que éste fuera la etapa del mecanismo que determine la velocidad de reacción de hidrólisis hasta obtener el producto KGA (**Fig 2**). En consecuencia, el mecanismo propuesto se explica con una cinética de segundo orden (Morrison y Boyd, 1990), la cual deviene en una cinética de pseudo-orden uno porque la constante cinética de segundo orden (k) queda incluida en la constante de pseudo-orden uno (k_{AA}'), junto con la concentración de agua ($[H_2O]$):

$$r_{AA} = \frac{1}{v_i} \frac{d[AA]}{dt} = k[H_2O][AA] = k_{AA}'[AA] \quad (4)$$

De lo cual resultó que la constante cinética k_{AA}' varió con la HR de equilibración de las películas, determinado ello en trabajos previos (León y Rojas, 2007). En la ecuación 3, v_{AA} es el coeficiente estequiométrico para el AA en su reacción de hidrólisis (aquí $v_{AA} = 1$), r_{AA} es la velocidad de reacción definida por unidad de volumen a temperatura constante, $[AA]$ es la concentración de AA remanente, $[H_2O]$ la concentración de agua remanente, k es la constante cinética de segundo orden para la reacción de hidrólisis del AA, k_{AA}' es la constante cinética de pseudo primer-orden para la hidrólisis del AA. Por lo tanto, la concentración de agua participa en la constante de velocidad (k_{AA}') ya que se determina a partir de la medición de la concentración de AA remanente ($[AA]$) después de cada ensayo. En consecuencia, la disponibilidad de agua ($[H_2O]$) es una característica de la constante de velocidad de pseudo-primer orden (k_{AA}') obtenida por ajuste estadístico de los datos de AA (**Fig. 2**).

De los ajustes lineales de los datos mostrados en la **Figura 1** (líneas continuas), se determinó el valor de la pendiente correspondiente y en consecuencia, la constante de velocidad de hidrólisis del AA en cada película (k_{AA}'), las cuales se reportan en la **Tabla 2**. La máxima estabilidad del AA se observó en las películas compuestas cargadas con fibra de zanahoria $53\mu m$, en las cuales se observó la menor constante de velocidad de hidrólisis k_{AA}' . Las constantes de velocidad aumentaron significativamente ($p < 0,05$) con el tamaño de partícula, siendo iguales los valores de las constantes de velocidad determinados para el AA soportado en las películas sin fibra (0% fibra-LMP) y en las películas compuestas cargadas con $210\mu m$ de tamaño medio (**Tabla 2**). Los valores de tiempo de vida media calculados a partir de la constante de velocidad k_{AA}' correspondiente (ecuación 2), se reportan también en la **Tabla 2**.

Como fuera determinado a través del presente estudio de estabilidad del AA en las películas desarrolladas, puede inferirse que la matriz polimérica constituida por partículas de fibra de zanahoria de $53\mu m$, puenteadas por cadenas poliméricas de pectina de bajo metoxilo (LMP), podría haber producido la mayor inmovilización del agua en la matriz.

Tabla 2. Constantes cinéticas de velocidad de hidrólisis^{1,2,3} (pseudo-primer orden) para la degradación del ácido L-(+)-ascórbico (AA) en las películas comestibles, almacenadas a humedad relativa (57,7%) y temperatura (25,0°C) constantes.

	Película LMP	Películas compuestas		
		Tamaño medio de partícula (μm)		
		53	105	210
$k_{AA}' \times 10^6 \text{ (min}^{-1}\text{)}^3$	5,9±0,2 ^A	4,3±0,1 ^B	5,3±0,2 ^C	6,0±0,2 ^A
$t_{1/2} \text{ (d)}^4$	82	111	91	80

¹Se reporta la media y el desvío estándar ($n=3$).

²Letras mayúsculas diferentes como supraíndice en una misma fila indica que existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

³Constantes de velocidad de hidrólisis (pseudo-primer orden) del AA.

⁴Tiempo de vida media del AA en la película, expresado en días (d), calculado según orden uno de reacción.



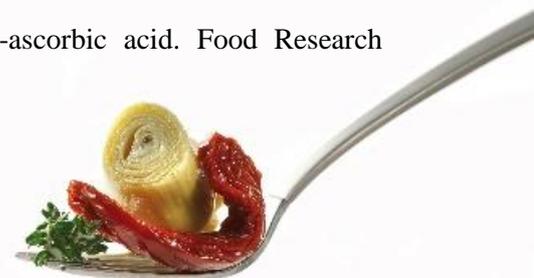
CONCLUSIÓN

Se observó que las películas compuestas mostraron poder reductor residual. Al agregar AA, la estabilidad hidrolítica del mismo dependió del tamaño de partícula de la fibra cargada. La máxima estabilidad del AA fue observada en la PCC con fibra de zanahoria de 53 μm , seguida por aquella conteniendo FZ de 105 μm . Estos resultados mostrarían que el agregado de fibra pudo haber contribuido a la inmovilización del agua en la matriz, lo que constituye un factor determinante de la pérdida de AA por hidrólisis.

El tamaño de partícula afectó significativamente las propiedades de hidratación de la fibra de zanahoria. La fibra de zanahoria de 53 μm mostró la menor capacidad de hidratación y produjo, por otro lado, la película compuesta menos flexible, debido probablemente a la formación de una matriz polimérica de fibras de zanahoria interconectadas por las macromoléculas de Ca-LMP, actuando como un entrecruzante múltiple y como un ocupante rígido de los espacios de la red. Esta matriz produjo en consecuencia, la máxima estabilización del AA cargado en las películas, equilibradas a 57,7% de HR, a 25.0°C, bajo vacío y en la oscuridad. El AA actuaría como un sensor de la disponibilidad o movilidad del agua en la nanoestructura de las películas equilibradas.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldwin EA, Nisperos MO, Chen X, y Hagenmaier RD. 1996. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 9: 151-163.
- Cagri A, Ustunoi Z, y Ryser ET. 2001. Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-Based Edible Films Containing Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal of Food Science*, 66 (6): 865-870.
- Chillo S, Flores S, Mastromatteo M, Conte A, Gerschenson L, y Del Nobile MA. 2008. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88(2): 159-168.
- De'Nobili MD, Pérez CD, Navarro DA, Stortz CA, y Rojas AM. 2013a. 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.
- De'Nobili MD, Curto LM, Delfino JM, Soria M, Fissore EN, y Rojas AM. 2013b. Performance of alginate films for retention of L-(+)-ascorbic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 450: 95-103.
- Esteve MJ, Frígola A, Martorell L, y Rodrigo C, 1999. Kinetics of green asparagus ascorbic acid heated in a high-temperature thermoresistometer. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A (Springer)*, 208(2): 144-147.
- FernándezCervera M, Karjalainen M, Airaksinen S, Rantanen J, Krogars K, Heinämäki J, IraizozColarte A, y Yliruusi J. 2004. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutical Biopharm*, 58: 69-76.
- Flores S, Famá L, Rojas A, Goyanes S, y Gerschenson L. 2007a. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40: 257-265.
- Flores S, Haedo A, Campos C, y Gerschenson L. 2007b. Antimicrobial Performance of Potassium Sorbate Supported in Tapioca Starch Edible Films. *Eur. Food Res. and Technol*, 225 (3-4): 375-384.
- Gordon MH. 2001. The development of oxidative rancidity in foods. In the Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva and Michael Gordon edited "Antioxidants in Food", Chapter 2, pp. 17. Published by Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge, UK.
- Guilbert S. 1986. Technology and application of edible protective films. In *Food packaging and preservation: theory and practice* (Ed M.Mathlouthi), pp. 371-394. London, UK: Elsevier Applied Science Publishing Co.
- Gutiérrez J, Barry-Ryan, C, y Bourke R. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 91-97.
- Han JH, y Gennadios 2005. Edible films and coatings: a review. In: Han JH (Ed.), *Innovations in Food Packaging*, pp. 239-262. Oxford, UK: Elsevier Academic Press.
- Labuza TP, McNally, L, Gallagher D, Hawkes J, y Hurtado F. 1972. Stability of intermediate moisture foods. 1. Lipid oxidation. *Journal of Food Science*, 37: 154-159.
- Lee S, y Labuza T. 1975. Destruction of ascorbic acid as a function of water activity. *Journal of Food Science*, 40: 370-373.
- León PG, y Rojas A.M. 2007. Gellan gum films as carriers of L-(+)-ascorbic acid. *Food Research International*, 40: 565-575.



Morrison RT, & Boyd RN. 1990. Química Orgánica (pp. 190, 211, 233). S. A., Wilmington, Delaware, USA: Addison-Wesley Iberoamericana.

Phan TD, Debeaufort F, Voilley A, y Luu D. 2009. Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *J Food Eng.* 90: 548–558.

Rojas AM, y Gerschenson LN. 2001. Ascorbic acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion. *Journal of the Science in Food and Agriculture*, 81: 1433-1439.

Saguy I, Kopelman IJ, y Mizrahi S. 1978. Simulation of ascorbic acid stability during heat processing and concentration of grapefruit juice. *Journal of Food Process Engineering*, 2(3): 213-225.

Yanishlieva-Maslarova NV, y Heinonen IM. 2001. Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in Food* (pp. 211). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires, por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) y ANPCyT.



Preservación de frutos de arándano mediante tecnologías no convencionales

Jaramillo-Sánchez G. ⁽¹⁾, Contigiani E. ⁽¹⁾, Hodara K. ⁽²⁾, García-Loredo A. ^(3,4), Alzamora S.M. ^(1,4), Nieto A. ^(1,4)

- (1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- (2) Departamento de Métodos Cuantitativos y Sistemas de Información, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- (3) Grupo de Investigación Preservación y Calidad de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- (4) CONICET, Argentina. gmjaramillo@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de tratamientos con ozono y radiación UV-C sobre la flora fúngica nativa, la pérdida de peso y las propiedades mecánicas de arándanos durante su almacenamiento refrigerado. Los frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* variedad O'Neal) fueron sumergidos en agua ozonizada ($3,0 \pm 0,1$ y $5,1 \pm 0,1$ ppm; 1,5 L) a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 0 (control) y 20 min ó irradiados con luz UV-C (254 nm; $5,3 \text{ kJ/m}^2$) durante 7 min. Los frutos ozonizados e irradiados fueron almacenados a 3 ± 1 y $8 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente. El porcentaje de frutos infectados de los arándanos expuestos a 5,1 ppm O_3 (12,5%) y 3 ppm O_3 (14,7%) resultó significativamente menor al del control (21,7%); igual comportamiento se observó en las muestras irradiadas (12,2%) respecto al control (28,9%). La pérdida de peso aumentó en todas las muestras durante el almacenamiento. No hubo diferencias significativas en las propiedades mecánicas de frutos tratados y control pero sí en los diferentes días de almacenamiento evaluados. Estos resultados demuestran que las dosis de ozono y UV-C estudiadas permitirían disminuir el desarrollo fúngico preservando las propiedades mecánicas de los frutos de arándano.

Palabras clave: Ozono, UV-C, arándano, calidad, flora fúngica.

ABSTRACT

This work investigated the effect of aqueous ozone and UV-C irradiation on fungal spoilage, weight loss and mechanical properties of blueberries under refrigerated storage. Blueberry fruits (*Vaccinium corymbosum* cv. O'Neal) were immersed in ozonized water (3.0 ± 0.1 and 5.1 ± 0.1 ppm; 1.5 L) for 0 (control) and 20 min or exposed to UV-C light (254 nm, 5.3 kJ/m^2) for 7 min. Ozonized and irradiated fruits were stored at 3 ± 1 and $8 \pm 1^\circ\text{C}$, respectively. The percentage of infected fruits in ozonized blueberries at 5.1 ppm O_3 (12.5%) and 3 ppm O_3 (14.7%) was significantly lesser than that of non-treated fruit (21.7%); the same tendency was observed in irradiated fruits (12.2%) respect to control (28.9%). An increase in weight loss was observed in treated and non-treated fruits throughout storage. Non significant differences were observed in mechanical properties between treated and untreated fruits, but they varied with storage time. This study indicated that ozone and UV-C treatments at the doses assayed would allow extending the shelf life of blueberry fruit without affecting its mechanical properties.

Keywords: Ozone, UV-C, blueberry, quality, fungal decay.

INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda de productos naturales similares a los frescos por parte del público consumidor conlleva al gran desafío de la industria frutícola de obtener productos inocuos con excelentes características organolépticas. En las últimas décadas se han estudiado y desarrollado tecnologías de procesamiento mínimo con el objetivo de cumplir estas demandas. Estas tecnologías deben proveer alimentos con la suficiente vida útil para ser transportadas desde su lugar de producción hasta el consumidor con el mínimo deterioro en sus propiedades nutricionales y organolépticas: color, textura y flavor. Entre las principales tecnologías



estudiadas se encuentran el uso de luz pulsada de alta intensidad, luz ultravioleta (UV-C), ultrasonido de alta intensidad, y ozono (Alzamora y col., 2000; Ngadi y col., 2012).

El ozono se caracteriza por su alto poder oxidante y su corta vida útil, que se traducen en propiedades bactericidas y viricidas, y la ausencia de residuos en el producto. En el año 2002, la FDA aprobó su uso en el tratamiento post-cosecha de frutas y vegetales. Diversos estudios han establecido la efectividad del uso de agua ozonizada para el lavado de frutos finos que fueron previamente inoculados con patógenos tales como *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella enterica* (Bialka y col. 2008, Pangloli y Hung 2013). Por otro lado, la radiación UV-C ha sido utilizada históricamente para la desinfección de superficies, de instrumental de laboratorio e incluso algunas áreas de trabajo de industrias alimenticias. Existen numerosas publicaciones respecto a su efectividad contra microorganismos patógenos e incluso se destaca su efecto precursor de respuestas horméticas que pueden mejorar las características organolépticas de los frutos, como textura o síntesis de compuestos de interés biológico (Perkins-Veazie et.al. 2008, Charles et.al. 2009). Sin embargo, el efecto de estas tecnologías sobre la flora nativa suele presentar diferencias con respecto a microorganismos patógenos inoculados, estando dicha respuesta influenciada por condiciones ambientales y geográficas, variedad del cultivo y/o fecha de cosecha.

El cultivo de arándano es relativamente joven en Argentina, siendo su principal aprovechamiento económico la exportación del fruto fresco a los Estados Unidos. Las principales variedades plantadas en el país son O'Neal y Misty, siendo O'Neal la predominante en la provincia de Buenos Aires. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de tratamientos con ozono y radiación UV-C sobre la flora fúngica nativa, la pérdida de peso y las propiedades mecánicas (fuerza de ruptura, F_R ; deformación en el punto de ruptura, D_R ; y trabajo, W) de arándanos durante el almacenamiento refrigerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se utilizaron frutos orgánicos de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano alto) variedad O' Neal provenientes de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Los frutos fueron cosechados en el mes de noviembre de los años 2014 y 2015. Se trabajó con un lote homogéneo para evitar la variabilidad debido al estadio de madurez. Para la selección de los frutos se tomó en cuenta el tamaño, la forma y la ausencia de infección microbiológica o daño físico. El tamaño de los frutos para el lote correspondiente al año 2014 fue de aproximadamente $1,5 \pm 0,5$ cm de diámetro, el valor de pH de $3,5 \pm 0,5$ y el contenido de sólidos solubles de $12,5 \pm 1,2$ °Brix. Con respecto al lote correspondiente al año 2015, el tamaño de los frutos fue aproximadamente de $1,5 \pm 0,5$ cm de diámetro, el valor de pH de $3,9 \pm 0,1$ y el contenido de sólidos solubles de $12,1 \pm 0,1$ °Brix. Los arándanos fueron almacenados en refrigeración ($3 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta 30 min antes de su utilización.

Aplicación de ozono en fase acuosa

Las muestras fueron ozonizadas en un equipo provisto de un generador de ozono UTK-O-4 (Unitek S.A., Argentina), una columna de burbujeo con difusor incluido y un tanque de oxígeno. Se emplearon dos concentraciones de ozono en la corriente gaseosa de entrada a la columna de burbujeo: 10 ppm y 18 ppm. El ozono se burbujeo en forma continua en 1500 ml de agua destilada a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. El ozono disuelto en fase líquida fue determinado por el método colorimétrico Índigo; luego de 10 min de exposición las concentraciones de ozono en la fase acuosa fueron de $3,0 \pm 0,1$ y $5,1 \pm 0,1$ ppm, respectivamente, permaneciendo constantes hasta el final del proceso. Con el objeto de evaluar el efecto del ozono *per se* y descartar la contribución en la reducción microbiana del lavado con agua, se consideraron diferentes controles: frutas frescas sin ningún tipo de lavado (FF) y frutas expuestas al burbujeo de oxígeno en agua durante 20 min (Control O_2 20 min), es decir con el generador de ozono apagado.

El impacto de la dosis de ozono en fase acuosa sobre la flora nativa del arándano (ensayos microbiológicos) y algunos parámetros de calidad (pérdida de peso y propiedades mecánicas) fue evaluado en las muestras correspondientes al lote del año 2014, expuestas a ambas concentraciones de ozono durante 0 y 20 min.

Aplicación de luz UV-C

La cabina de exposición a la luz UV-C estaba provista de cuatro lámparas germicidas (máxima emisión a 253,7 nm, TUV* 15W G13 T8 55V, Philips, Holanda), 2 colocadas en la parte superior (TUV -15 W c/u) y 2 laterales (TUV-6 W c/u) dentro de una caja de madera herméticamente cerrada (40 cm de alto x 100 cm de largo x 30 cm de ancho). Las muestras fueron ubicadas sobre un agitador M-23 Vicking (Argentina) forrado con papel aluminio a 250 rpm, centrado y colocado a 8 cm de distancia por debajo de las lámparas superiores



y 30 cm a cada lado de las lámparas laterales. La cabina contó con un sistema de ventilación (Ecoclima, Argentina) para evitar el incremento de temperatura producido por la radiación UV-C. La temperatura promedio alcanzada durante los tratamientos fue de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Antes de su uso, las lámparas se estabilizaron durante 30 min.

Para evaluar el impacto de la dosis de UV-C sobre la flora nativa del arándano, la pérdida de peso y las propiedades mecánicas, se emplearon las frutas correspondientes al lote del año 2015. Los frutos se irradiaron durante 7 min, correspondiendo a una dosis de $5,3 \text{ kJ/m}^2$, determinada con un radiómetro (BroadbandPower/energy Meter 13 PEM 001, Melles Griot, EEUU).

Se utilizó como control frutos que fueron agitados en la cabina bajo las mismas condiciones pero con las lámparas apagadas.

Almacenamiento de las muestras

Las muestras tratadas y las muestras control (sin tratamiento) fueron almacenadas en bandejas plásticas de polipropileno de alta densidad con tapa permeable al aire a 3 y $8 \pm 1^\circ\text{C}$ (muestras tratadas con ozono y UV-C, respectivamente) durante períodos de 0, 5, 10, 15 y 20 días. Los parámetros de calidad (propiedades mecánicas y pérdida de peso) fueron evaluados solo hasta los 15 días de almacenamiento.

Estudios microbiológicos

El estudio microbiológico de las muestras tratadas y sin tratar durante el almacenamiento fue realizado por inspección visual. Noventa frutos, dispuestos en 3 bandejas (réplicas) con 30 frutos cada una, fueron evaluados diariamente durante 20 días de almacenamiento. Aquellos frutos donde se presentó un mínimo crecimiento fúngico se consideró como fruto infectado y se descartó inmediatamente. El número de frutos infectados de las muestras tratadas y sin tratar (control) fue expresado como porcentaje de frutos infectados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$FI (\%) = \frac{f_t}{f_o} \cdot 100 \quad (1)$$

donde: FI (%) = porcentaje de frutos infectados; f_o = número de frutos en el día 0, f_t = número de frutos infectados a un tiempo t.

Pérdida de peso

La pérdida de peso (PP) de los frutos de arándano frescos y tratados se evaluó determinando el peso de los mismos en el día 0, 5, 10 y 15 de almacenamiento. Se empleó una balanza Adventurer HOAUS modelo ARA520 (Ohaus Corp., USA) con una precisión de $\pm 0,01 \text{ g}$. Los resultados fueron expresados como porcentaje de variación de peso con respecto al de la muestra fresca o tratada en el día 0, según la siguiente ecuación:

$$PP(\%) = \frac{100 \times (p_t - p_o)}{p_o} \quad (2)$$

donde: PP(%) = porcentaje de pérdida de peso de la muestra; p_o = peso inicial de la muestra al día 0, p_t = peso de la muestra a un tiempo t.

Se evaluó la PP (%) en 30 frutos para cada condición.

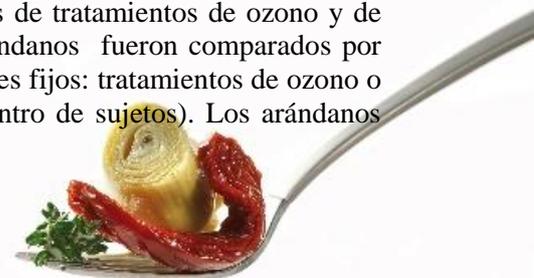
Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se evaluaron mediante ensayos de penetración. Se empleó un Texturómetro Universal marca Instron, modelo 3035 (velocidad del cabezal: 50 mm/min; rango de carga: 50 N; diámetro punta: 3 mm, $T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$). Se registró la fuerza máxima de ruptura (F_R), la deformabilidad correspondiente a la F_R , (D_R), el trabajo (W) y el “módulo de deformabilidad” (M_d).

Los ensayos fueron realizados en 30 frutos por cada condición, inmediatamente después del tratamiento y durante el almacenamiento.

Análisis estadístico

El número de frutos infectados promedio (%) fue evaluado según la dosis y el tiempo de almacenamiento con un ANOVA de dos factores y se aplicó un test de Tukey (con un nivel de confianza del 95%) cuando se encontraron diferencias significativas entre promedios de efectos principales o de interacción. Los datos de las propiedades mecánicas fueron analizados mediante un análisis de varianza multivariado (MANOVA). Las comparaciones de medias multivariadas entre tratamientos se realizaron usando un test de Hotelling corregido por Bonferroni (con un nivel de confianza del 95%). Los efectos de tratamientos de ozono y de UV-C a lo largo del tiempo sobre el porcentaje de pérdida de peso de arándanos fueron comparados por Modelos lineales generales mixtos (GLMMs). Cada modelo incluyó 2 factores fijos: tratamientos de ozono o de UV-C (factor entre sujetos) y tiempo (5, 10 y 15 días, como factor dentro de sujetos). Los arándanos



individuales fueron incluidos en el análisis como factor aleatorio. Las comparaciones entre promedios de efectos principales o de términos de interacción se realizaron usando tests LSD Fisher cuando se detectaron diferencias significativas. Los modelos seleccionados fueron aquellos que presentaron menor valor de AIC (Criterio de Información de Akaike). Este criterio permite identificar el modelo que explique la mayor variación en el porcentaje de pérdida de peso en arándanos con la menor cantidad de parámetros a estimar.

Los resultados fueron expresados como el valor medio \pm la desviación estándar y se analizaron utilizando el software estadístico Infostat v.2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y R 3.0.3 (R Development Core Team, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los tratamientos con ozono y luz UV-C en la flora nativa de arándanos

La **Figuras 1 y 2** muestran la evolución del porcentaje de frutos infectados para las dosis de **ozono** y **UV-C** ensayadas. Durante la inspección visual se observó para todos los tratamientos un efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos de los frutos tratados con respecto a los frutos control.

Los frutos tratados con ambas concentraciones de ozono ($3,0 \pm 0,1$ y $5,1 \pm 0,1$ ppm) después de 20 días de almacenamiento presentaron 14,7 y 12,5% de frutos infectados, respectivamente. En contraste, las muestras control, FF y Control O₂ 20 min, presentaron un porcentaje de frutos infectados de 27,5 y 21,7 %, respectivamente.

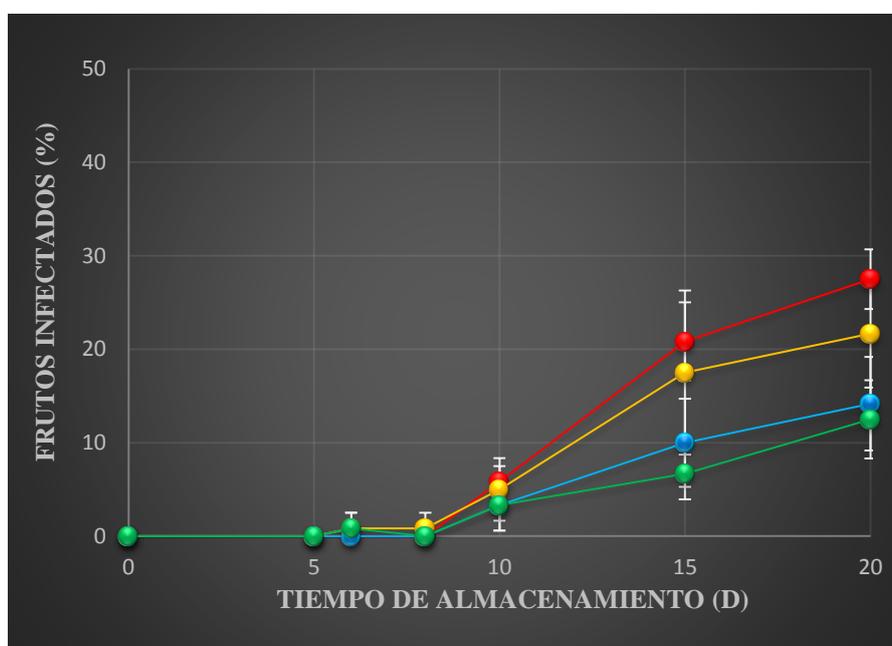


Figura 1. Valores medios de frutos infectados (%) para arándanos expuestos a 3,0 y 5,1 ppm de ozono durante 20 min de exposición y almacenados a 3 ± 1 °C: (●), FF (●), O₂ 20 min; (●), 3 ppm O₃; (●), 5,1 ppm O₃.

El análisis estadístico no mostró interacción entre las concentraciones ensayadas y los días de almacenamiento ($p= 0,6897$) es decir, las diferencias entre tratamientos no se modificaron con el tiempo. El % de frutos infectados de las muestras tratadas fue significativamente menor al de las frutas control ($p < 0,0001$); sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las dosis de ozono ensayadas ni tampoco entre los controles analizados.

Con respecto a las muestras irradiadas con UV-C a una dosis de $5,3 \text{ kJ/m}^2$, el valor medio del porcentaje de los frutos infectados fue 12,2% luego de 20 días de almacenamiento, mientras que para el control fue del 28,9%. Las muestras irradiadas presentaron infección a partir del día 14, mientras que el control lo hizo al séptimo día de almacenamiento. El análisis estadístico no mostró interacción entre los tratamientos ensayados y los días de almacenamiento ($p = 0,8879$). El número de frutos infectados (%) de las muestras tratadas fue significativamente menor ($p < 0,05$) al de las frutas control.



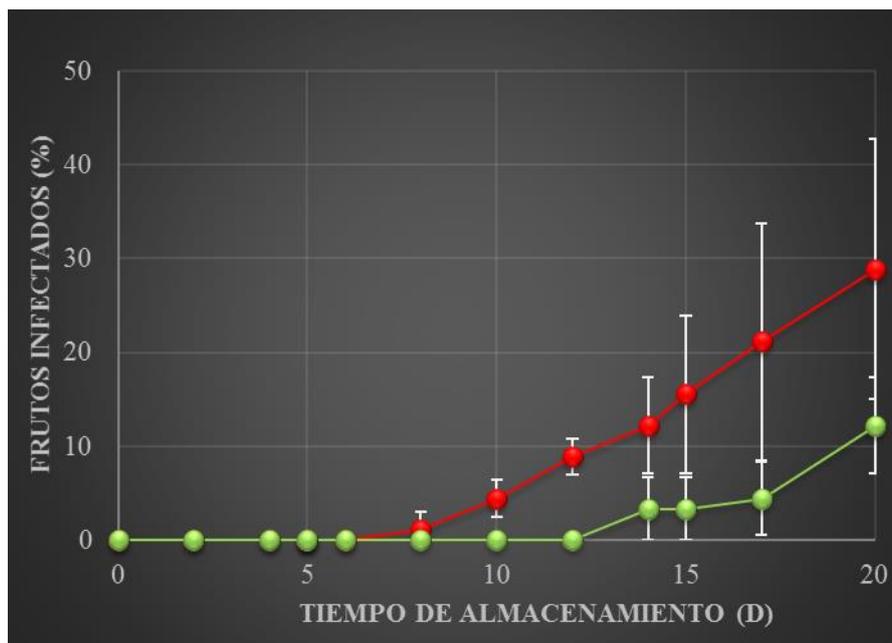


Figura 2. Valores medios de frutos infectados (%) para (●) arándanos control e (●) irradiados con una dosis de 5,3 kJ/m² de UV-C, almacenados a 8 ± 1°C.

Efecto de los tratamientos con ozono y UV-C en la pérdida de peso de arándanos

En la **Tabla 1** se muestran los porcentajes de pérdida de peso (PP %) de las muestras control y ozonizadas a lo largo del almacenamiento. Tanto las muestras control como las tratadas con ozono mostraron una disminución del peso durante el almacenamiento.

La PP (%) de las muestras control y de los arándanos ozonizados en las dosis evaluadas se incrementó significativamente ($p < 0,001$) conforme aumentó la concentración de ozono y el tiempo de almacenamiento; los frutos correspondientes al control mostraron el menor valor de PP (%) en el día 5 ($0,4 \pm 0,3$) mientras que el mayor correspondió a los frutos sometidos a 5,1 ppm de ozono durante 20 min en el día 15 de almacenamiento ($2,9 \pm 1\%$).

En la **Tabla 2** se muestra la pérdida de peso (PP %) de las muestras control y las irradiadas con UV-C a lo largo del almacenamiento. De acuerdo a los resultados obtenidos para los frutos de arándano, no hubo diferencia significativa ($p = 0,2387$) en el PP % de las muestras control y las irradiadas, sin embargo, durante el almacenamiento el PP% fue incrementándose significativamente ($p < 0,001$) tanto en las muestras control así como en las irradiadas, llegando a valores de 6,54 y 7,40 respectivamente.

Tabla 1. Valores medios de pérdida de peso de arándanos fresco (control) y tratados a distintos tiempos de exposición y diferentes concentraciones de ozono, almacenados a 3°C durante 15 días.

Concentración de ozono: tiempo de exposición	Tiempo de almacenamiento (d)						
	5		10		15		
	PP (%)	± DE	PP (%)	± DE	PP (%)	± DE	
FF	0,4	± 0,3	1,3	± 0,4	1,9	± 0,5	A
3,0 ppm:20 min	0,7	± 0,5	1,4	± 0,5	2,1	± 0,5	a,b
5,1 ppm:20 min	1,3	± 0,5	2,3	± 0,8	2,9	± 1,0	C
	A		B		C		

DE: desvío estándar de la muestra.

Tratamientos identificados con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Días de almacenamiento identificado con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas

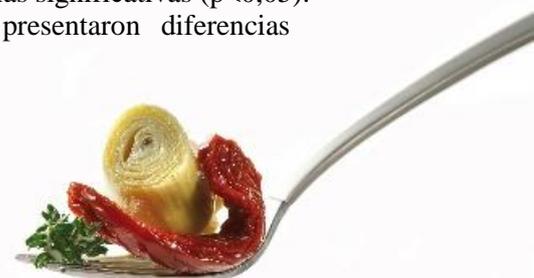


Tabla 2. Valores medios de pérdida de peso (%) de arándanos fresco (control) e irradiados con UV-C, almacenados a 8°C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (d)									
	5			10			15			
	PP (%)	±	DE	PP (%)	±	DE	PP (%)	±	DE	
control	2,3	±	1,2	4,3	±	1,6	6,5	±	2,2	a
UV-C	2,3	±	0,1	4,7	±	1,8	7,4	±	2,0	a
	A			B			C			

DE: desvío estándar de la muestra.

Tratamientos identificados con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Días de almacenamiento identificado con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas

Efecto de los tratamientos con ozono y UV-C en las propiedades mecánicas de arándanos

La epidermis del arándano ejerció el mayor efecto en las propiedades mecánicas, contribuyendo aproximadamente en 90% de la firmeza de la fruta antes del punto de ruptura. Las muestras presentaron un pico de fractura seguido de una caída abrupta de la fuerza.

Los valores medios de los parámetros mecánicos medidos en los frutos frescos (control) y tratados con ozono se muestran en la **Tabla 3**. Se puede observar que el comportamiento de los frutos de arándano fue similar independientemente del tratamiento aplicado. El análisis estadístico realizado señaló que no hubo interacción ($p = 0,0528$) entre las concentraciones estudiadas y los días de almacenamiento. No hubo diferencias significativas entre las muestras tratadas y el control; si bien el análisis estadístico señaló diferencias significativas entre las muestras tratadas con diferentes concentraciones de ozono (3 y 5,1 ppm), el comportamiento en los parámetros evaluados fue muy similar. Durante el almacenamiento las propiedades mecánicas de los frutos fueron significativamente similares en el día 0 y 5, las muestras almacenadas durante el día 10 y 15 difirieron significativamente del día 0.

145

Tabla 3. Valores promedio de F_R , D_R , W y M_d de arándanos fresco (control) y tratados con ozono a distintas concentraciones, almacenados a 3°C durante 15 días.

Tiempo de almaceamiento (d)	Tratamiento	F_R (N)	±	DE	D_R (mm)	±	DE	W (mJ)	±	DE	M_d (N/mm)	±	DE	
0	FF	2,3	±	0,5	4,1	±	0,6	5,5	±	1,6	0,9	±	0,3	a,b A
	3,0 ppm: 20 min	2,3	±	0,5	4,3	±	0,6	5,8	±	1,9	0,8	±	0,3	a A
	5,1 ppm: 20 min	2,2	±	0,4	4,2	±	0,8	5,5	±	1,7	0,8	±	0,3	b A
5	FF	2,2	±	0,6	4,2	±	0,6	5,2	±	1,7	0,7	±	0,3	a,b A,B
	3,0 ppm: 20 min	2,2	±	0,5	4,5	±	0,9	5,7	±	1,8	0,7	±	0,3	a A,B
	5,1 ppm: 20 min	2,5	±	0,4	4,6	±	0,8	6,8	±	1,2	0,9	±	0,2	b A,B
10	FF	2,3	±	0,6	4,8	±	0,8	6,4	±	1,8	0,7	±	0,3	a,b B
	3,0 ppm: 20 min	2,4	±	0,7	4,4	±	0,7	6,1	±	2,1	0,8	±	0,3	a B
	5,1 ppm: 20 min	2,4	±	0,6	4,6	±	0,9	6,4	±	1,8	0,8	±	0,3	b B
15	FF	2,5	±	0,7	4,5	±	0,8	6,4	±	2,1	0,8	±	0,3	a,b B
	3,0 ppm: 20 min	2,4	±	0,8	4,4	±	0,6	6,0	±	1,9	0,8	±	0,3	a B
	5,1 ppm: 20 min	2,3	±	0,7	4,4	±	0,9	5,7	±	1,8	0,8	±	0,3	b B

DE: desvío estándar de la muestra.

Tratamientos identificados con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Días de almacenamiento identificados con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas



Tabla 4. Valores promedio de F_R , D_R , W y M_d de arándanos fresco (control) e irradiados con UV-C, almacenados a 8°C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (d)	Tratamiento	F_R (N) \pm SD	D_R (mm) \pm SD	W (mJ) \pm SD	M_d (N/mm) \pm SD	
0	control	2,4 \pm 0,4	4,2 \pm 0,7	5,9 \pm 1,4	0,9 \pm 0,3	b
	UV-C	2,4 \pm 0,4	4,2 \pm 0,6	6,0 \pm 1,5	0,9 \pm 0,2	b,c
5	control	2,4 \pm 0,7	4,4 \pm 0,9	5,7 \pm 1,8	0,8 \pm 0,4	c,d
	UV-C	2,8 \pm 0,5	4,8 \pm 0,7	7,3 \pm 1,8	0,8 \pm 0,3	d
10	control	2,8 \pm 0,5	4,3 \pm 0,5	6,8 \pm 1,4	0,9 \pm 0,2	c,d
	UV-C	2,8 \pm 0,6	4,9 \pm 0,8	7,5 \pm 1,9	0,8 \pm 0,3	d
15	control	2,4 \pm 0,5	4,9 \pm 1,1	6,5 \pm 2,0	0,7 \pm 0,2	d
	UV-C	3,2 \pm 0,5	5,5 \pm 0,90	8,7 \pm 1,9	0,7 \pm 0,2	a

DE: desvío estándar de la muestra.

Tratamientos identificados con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

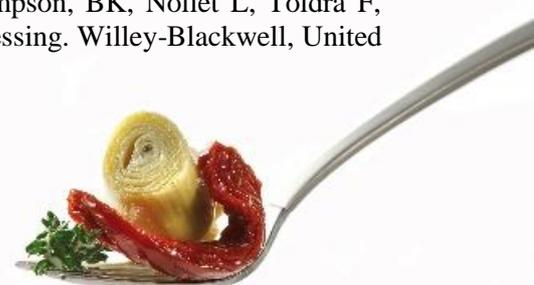
Los valores promedio de los parámetros mecánicos medidos en los frutos frescos (control) e irradiados con UV-C se muestran en la **Tabla 4**. El comportamiento de los parámetros mecánicos estudiados (F_R , D_R , W y M_d) fue similar entre muestras tratadas y control. Durante el almacenamiento dichos parámetros fueron variando: en general la fuerza máxima de ruptura (F_R) y la deformabilidad (D_R) se incrementaron y como consecuencia, también el trabajo (W) para romper la epidermis; el “módulo de deformabilidad” (M_d), por el contrario, fue disminuyendo. Este comportamiento podría deberse a que el fruto fue madurando durante el almacenamiento. El análisis estadístico señaló interacción significativa entre el tratamiento y los días de almacenamiento ($p < 0,001$). Inmediatamente después del tratamiento con UV-C y durante los primeros 10 días de almacenamiento, los frutos no mostraron diferencias significativas con respecto al control. En el día 15 de almacenamiento, las muestras irradiadas mostraron un incremento significativo en los valores de F_R y D_R con respecto al control, lo que podría indicar una respuesta hormética del fruto a la irradiación. Las muestras almacenadas durante 5, 10 y 15 días difirieron significativamente de las del día 0.

CONCLUSIONES

El tratamiento con ozono y UV-C en las dosis estudiadas permitió retardar el desarrollo fúngico en arándanos sin afectar de manera relevante sus propiedades mecánicas. Sin embargo, la selección de la dosis de ozono a emplear (concentración y tiempo de exposición) estaría condicionada por la pérdida de peso, la cual se vio afectada significativamente cuanto mayor fue la dosis de ozono aplicada a los frutos. La pérdida de peso inducida por la irradiación UV-C no presentó diferencias significativas respecto a la de la fruta sin tratar, si bien la temperatura de almacenamiento tendría un rol importante en la misma.

BIBLIOGRAFÍA

- Alzamora SM, Lopez-Malo A, Tapia MS. 2000. Overview. En: Alzamora SM, Tapia MS and Lopez-Malo A, editores. Minimally processed fruits and vegetables, Aspen Publishers Inc., Maryland, EEUU. pag. 1-9.
- Bialka K, Demirci A. 2007. Utilization of gaseous ozone for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on raspberries and strawberries. Journal of Food Protection, 70: 1093–1098.
- Charles MT, Tano K, Asselin A, Arul J. 2009. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. V. Constitutive defence enzymes and inducible pathogenesis-related proteins. Postharvest Biology and Technology, 51: 414– 424.
- Ngadi M, Bajwa SS, Alakali J. 2012. Minimally processed foods. En: Simpson, BK, Nollet L, Toldrá F, Benjakul S, Paliyath G, Hui YH, editores. Food biochemistry and food processing. Willey-Blackwell, United Kingdom. pag. 746-762.



Pangloli P, Hung Y. 2013. Reducing microbiological safety risk on blueberries through innovative washing technologies. *Food Control*, 32: 621-625.

Perkins-Veazie P, Collins JK, Howard L, 2008. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biology and Technology*, 47: 280–285.

R Development Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. Wien, Austria: R foundation for statistical computing.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET, ANPCyT, BID y SENESCYT (Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia e Innovación, Ecuador).



Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las características organolépticas y la conservación de pasta de garbanzo

Manera GA⁽¹⁾, Allende MJ⁽²⁾, Bressano M⁽¹⁾, Pérez Agostini MA⁽¹⁾

(1) Área de Gestión de la Producción de Agroalimentos FCA U.N.C.

(2) Mejoramiento Vegetal FCA U.N.C.

Córdoba, Argentina

Dirección email: gamanera@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las características organolépticas y la conservación de pasta de garbanzo. La elaboración de humus se realizó a partir de garbanzos (*Cicer arietinum* L.) de la variedad Norteño FCA-UNC. La pasta se envasó en frascos de vidrio y se sometió a tratamientos térmicos de conservación de esterilización en autoclave 121°C 5 minutos, pasteurización 100°C 20 minutos, sin tratamiento térmico: refrigerado a 10°C. La evaluación sensorial se realizó según escala hedónica no estructurada. El riesgo por contaminación microbiológica se determinó a través de la presencia de aerobios totales y anaerobios sulfito reductores a los 0 y 12 meses de elaborado. Los resultados indicaron que la aceptabilidad, apariencia y sabor, fueron las características que mejor explicaron la variabilidad en las respuestas, seguido del color y olor. La pasta sin tratamiento térmico fue la de mejor calificación en aceptabilidad y apariencia. La escala hedónica no estructurada mostró que la muestra sin tratamiento térmico y la pasteurizada no presentaron diferencias en la calificación del sabor, aceptabilidad y apariencia. No hubo desarrollo de microorganismos aerobios ni anaerobios en las muestras sometidas a tratamientos térmicos de conservación, después de 12 meses de almacenamiento. La pasta de garbanzo pasteurizada representa una alternativa de transformación de granos de garbanzo no exportables.

Palabras claves: Tratamientos térmicos, Características organolépticas, Conservación, Pasta de garbanzo

148

ABSTRACT

The aim of the work was to test the effect of different thermal treatments on the organoleptic properties and conservation of chickpea paste. Hummus was produced using the FCA-UNC variety of chickpeas (*Cicer arietinum* L.), typical of the northern region. The paste was packed in glass vessels and it underwent conservation thermal treatments of sterilization in autoclave 121° C, 5 minutes; pasteurization: 100° C, 20 minutes; no thermal treatment: refrigerated at 10° C. Sensory testing was done according to the unstructured hedonic scale. The risk of microbiological contamination was determined by the presence of total aerobes and sulfite-reducing anaerobes at months 0 and 12 after elaboration. Results showed that acceptability, appearance and flavor were the properties that best explained variability in the responses, followed by color and odor. Paste with no thermal treatment obtained the best qualification in terms of acceptability and appearance. Unstructured hedonic scale showed that not thermally treated and not pasteurized samples had no differences in flavor, acceptability and appearance. No aerobes or anaerobes microorganisms developed in the samples with thermal treatment of conservation after 12 months of storage. Pasteurized chickpea paste is an alternative for transforming chickpea grains not suitable for export.

Key words: thermal treatments, organoleptic properties, conservation, chickpea paste

INTRODUCCIÓN

Ante la necesidad de diversificar la matriz de productos agrícolas, la producción de garbanzo en Argentina ha mostrado una dinámica casi explosiva en los últimos años (SAGPyA 2013). Nuestro país ha pasado a ser, en un período corto de tiempo, de espectador a un actor protagonista del mercado mundial del garbanzo, integrando ya el selecto grupo de los grandes exportadores mundiales (Fundación Mediterránea 2013). Sin embargo, se redujo la producción de 106.212 tn en la campaña 2011/12 (Minagri 2014), a una cosecha de 59.580 toneladas registradas durante la campaña 2015/16 (Minagri 2016), debido a un complejo cuadro de



problemas agroecológicos y económicos que han provocado una merma en la superficie sembrada y rindes promedio.

De acuerdo a los reportes de Alimentos Argentinos (2013), el principal destino de nuestra producción de garbanzos es la exportación. Para ello se procesan los granos, y los de mayor calibre son destinados al mercado externo mientras que el resto debería ser destinado a la elaboración de otros alimentos de posible interés para el consumidor (Fundación Mediterránea 2013). Es de destacar que con la globalización y las modas de las cocinas étnicas, el consumo del garbanzo y más precisamente la pasta de garbanzo o humus se ha difundido inicialmente entre los consumidores vegetarianos y luego entre aquellos con conciencia de su salud (Kampf & Peleg 2002).

Desde el punto de vista nutricional, la incorporación de garbanzo en la dieta permite el aporte de altos contenidos de proteínas y fibra (Martínez et al. 2012), como así también elevada proporción de hidratos de carbono, minerales, vitaminas liposolubles e hidrosolubles, y otros numerosos componentes como flavonoides y ácidos fenólicos, siendo éstos una fuente alimenticia de antioxidantes activos (Wood & Grusak 2007, Aharon Segev et al. 2011). Sin embargo, se ha informado que las legumbres en general tienen escaso valor nutritivo debido a la baja digestibilidad de sus proteínas y a la presencia de factores antinutricionales (Saleh & El-Adawy 2006). Estas características pueden ser revertidas a través de la cocción, así la calidad de las proteínas mejora por destrucción o inactivación de factores antinutricionales lábiles al calor, según lo propuesto en garbanzo por Aharon Segev et al. (2011). Así también, el remojo seguido de cocción mejora la calidad de la fibra aportada por el garbanzo a la dieta (Vasishtha & Srivastava 2011).

La pasta se elabora a partir de granos de garbanzo secos, rehidratados, posteriormente cocidos y procesados. Posteriormente, no se somete a tratamientos térmicos, ni se le adiciona ningún conservante químico, por lo que el límite de su vida útil oscila entre 24 y 72 hs en condiciones de baja temperatura de refrigeración (Yamani & Al-Dababseh 1994). Además, las características intrínsecas de la pasta que incluyen bajo pH cercano a 5,1, actividad de agua alrededor del 98% y alto contenido en oligosacáridos (Yamani & Al-Dababseh 1994, Singh et al. 2004) hacen que se constituya en un medio propicio para el crecimiento de microorganismos (Ashenafi 1991, Ashenafi & Busse 1991, Garcia-Graells et al. 1999, Wood & Grusak 2007, Yamani & Mehayar 2011), lo que limita la producción a gran escala. Es de destacar que los microorganismos metabolizan rápidamente los azúcares, reflejándose en una disminución de los sólidos solubles y producen ácido láctico, modificando las características organolépticas de la pasta, desarrollando un fuerte sabor agrio y generando una textura acuosa (Yamani & Al-Dababseh 1994).

Según lo propuesto por Perkins et al. (1975) una de las maneras de garantizar la inocuidad alimentaria del humus podría ser la aplicación de un valor de esterilización de F_0 de 2,78 min a fin de evitar el desarrollo de esporas de *Clostridium botulinum*. Sin embargo, para inhibir el desarrollo de esta bacteria, Cheftel et al. (1992), Ress y Bettison (1994) proponen implementar la pasteurización como metodología alternativa más sencilla y de bajo costo. Estos tratamientos térmicos no han sido evaluados al aplicarlos en pasta de garbanzo a fin de asegurar su inocuidad al ser conservado en el tiempo, manteniendo las características organolépticas del producto.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las características organolépticas y la conservación de pasta de garbanzo

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La elaboración de humus se realizó a partir de granos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) de la variedad Norteño FCA - UNC, de calibre pequeño (más de 85 granos por cada 100 gramos) y granos partidos que no corresponden a la categoría exportable.

Elaboración de la pasta de garbanzo: se pesaron 2 kg de granos y se lavaron con agua corriente durante 3 min. Las muestras se colocaron en recipiente plásticos para ser hidratadas durante 12 horas (relación sólido/líquido 1:3) en agua fría (20°C±2) a fin de disminuir el tiempo de cocción y evitar la pérdida de nutrientes hidrosolubles y compuestos fenólicos libres totales (Vijayakumari et al. 1997, Aharon Segev et al. 2011). Posteriormente, se renovó el agua y se cocinó a ebullición hasta obtener granos tiernos y plásticos, sin desprendimiento del tegumento (fuente de fibra).

Posteriormente se procesó en licuadora, de acuerdo a la relación 3 partes de grano cocido y 1 parte de agua de cocción, a 3.600 rpm durante 2 min. La pasta obtenida se colocó en cacerola de acero inoxidable y se calentó hasta punto de ebullición, removiendo continuamente con cuchara de madera. Luego se agregó la



cantidad necesaria de jugo de limón hasta obtener un descenso de pH de 4,5 (Ahmed Kenawi 2003) medido con pehachímetro tipo Pocket marca Hanna Instruments U.S.A. modelo Checker.

Envasado: la pasta caliente (90°C) se envasó en frascos de vidrio transparentes de 450 g de capacidad, previamente lavados con agua corriente y detergente neutro. La pasta fue cuidadosamente dispuesta en forma manual, hasta 1 cm por debajo del borde superior, sin oclusión de aire. Los frascos se cerraron herméticamente con tapas de cuarto de rosca.

Los tratamientos térmicos de conservación aplicados en los frascos fueron:

- Esterilización: en autoclave de gas a 121°C durante 5 minutos (T1)
- Pasteurización: inmersión de los frascos en agua a 100°C por 20 minutos (T2)
- Sin tratamiento térmico: colocados a 10°C hasta su evaluación (T3)

Los frascos conservados con tratamientos térmicos (T1 y T2) se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C+/- 2) y oscuridad hasta el momento de su evaluación.

Las variables evaluadas fueron:

- Contaminación microbiológica: se determinó la presencia de aerobios totales por el método de recuento en placas (ICMSF 2014) y anaerobios sulfito reductores por el método de recuento en tubos (ISO 2003). Las evaluaciones se realizaron por triplicado en cada tratamiento, a los 0 y 12 meses de elaborado; los resultados se expresaron en UFC/g.
- Características sensoriales: se evaluaron en un grupo de 30 panelistas veganos, mayores de 30 años, habituados al consumo de pasta de garbanzo. Los caracteres sensoriales tenidos en cuenta fueron: olor, color, sabor, textura, apariencia y aceptabilidad. Los participantes determinaron la intensidad de los distintos atributos y fueron consultados respecto de su grado de aceptación en base a la escala gráfica hedónica no estructurada, de acuerdo a lo propuesto por Hedegaard et al. (2006).

Diseño y análisis estadístico

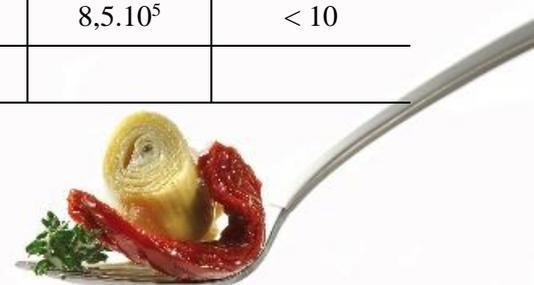
El diseño experimental fue en bloques al azar con tres tratamientos (T1: esterilizado, T2: pasteurizado, T3: sin tratamiento térmico). El modelo propuesto incluyó el efecto de los tratamientos y de bloques (cada juez = bloque). Para el análisis de datos se utilizó el análisis de varianza de datos transformados a valores numéricos, de acuerdo a lo propuesto por Romero Baranziniet al. (2010). Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tuckey ($p < 0.05$) usando el paquete estadístico InfoStat (2015). Se aplicó análisis multivariado y se compararon las distancias promedios de las ubicaciones de las respuestas en la escala.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados en la **Tabla 1** indican que los tratamientos térmicos aplicados no permitieron el desarrollo de microorganismos que representen riesgos para el consumo de la pasta evaluada, ni que induzcan cambios en sus características organolépticas. Por el contrario, la ausencia de tratamiento térmico permitió el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos que alteran el producto final. Lo observado es importante ya que la pasta de garbanzo es consumida preferentemente fresca, sin ningún tratamiento térmico, lo que determina la necesidad de cumplir con la fecha de caducidad del alimento manteniéndolo en condiciones de baja temperatura de almacenamiento.

Tabla 3: Microorganismos (UFC/g) presentes en pasta de garbanzo sometida a diferentes tratamientos térmicos a los 0 y 12 meses de conservación.

Período de conservación (meses)	Tratamiento térmico					
	Esterilizado		Pasteurizado		Sin tratamiento	
	Aerobios totales	Anaerobios Sulfito reductores	Aerobios totales	Anaerobios Sulfito reductores	Aerobios totales	Anaerobios Sulfito reductores
0	< 10	< 10	< 10	< 10	$8,5 \cdot 10^5$	< 10
12	< 10	< 10	< 10	< 10		



Es de destacar que desde el punto de vista microbiológico, los tratamientos térmicos aplicados resultaron adecuados para el control de los microorganismos, aún después de 12 meses de almacenamiento. Estos resultados acuerdan con lo postulados por Cheftel et al. (1992) y Ress y Bettison (1994).

En particular, el tratamiento térmico de esterilización, que es el indicado para aplicar en las conservas de legumbres debido a su pH mayor a 4,5 (Cheftel et al. 1992, Ress y Bettison 1994), fue según lo observado en este trabajo, adecuado para el control de los microorganismos, aún después de 12 meses de almacenamiento. Estos resultados coinciden con lo expresado por Perkins et al. (1975), ya que los valores de tiempo y temperatura de esterilización permitieron la destrucción de las esporas de organismos anaerobios sulfito reductores representado principalmente por *Clostridium botulinum*.

El tratamiento térmico de pasteurización, resultó igualmente satisfactorio para el control del desarrollo de microorganismos en pasta de garbanzo, en concordancia con lo expresado por Cheftel et al. (1992) y Ress y Bettison (1994). El tratamiento térmico puede permitir la presencia de esporas de *C. botulinum*; sin embargo el agregado de jugo de limón disminuyó el pH por debajo de 4,5 impidiendo su propagación y liberación de toxina.

Los resultados de la evaluación sensorial realizada se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Atributos sensoriales de pasta de garbanzo con diferentes tratamientos de conservación, evaluados por consumidores habituados.

Tratamiento	Atributo sensorial					
	Sabor	Color	Olor	Textura	Apariencia	Aceptabilidad
Esterilizado	5,52 b	3,22 a	4,12 a	4,66 a	5,66 a	6,10 a
Pasteurizado	2,29 a	2,86 a	4,33 a	5,28 a	6,66 b	6,97 b
Sin tratamiento	3,02 a	4,76 b	3,05 a	4,86 a	6,69 b	7,10 b

Cada valor representa el promedio de las distancias de acuerdo a escalas hedónicas no estructuradas.

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,01$) Tuckey

Respecto al olor y textura, los evaluadores no manifestaron diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, si hubo diferencias significativas al considerar aspectos tales como el sabor, color, apariencia y aceptabilidad. En base a la evaluación de apariencia y aceptabilidad, el tratamiento de pasteurización no mostró diferencias respecto al producto sin tratamiento. Esto resulta muy promisorio ya que los consumidores habituados prefieren la pasta de garbanzo recién elaborada. Es de destacar que el producto pasteurizado mantiene las características de sabor, textura y olor que contribuyen al grado de aceptabilidad.

Por el contrario el tratamiento de esterilización condujo a un producto de menor apariencia y aceptabilidad, debido al sabor intensamente amargo, olor más fuerte y color más claro respecto al resto de los otros tratamientos evaluados.



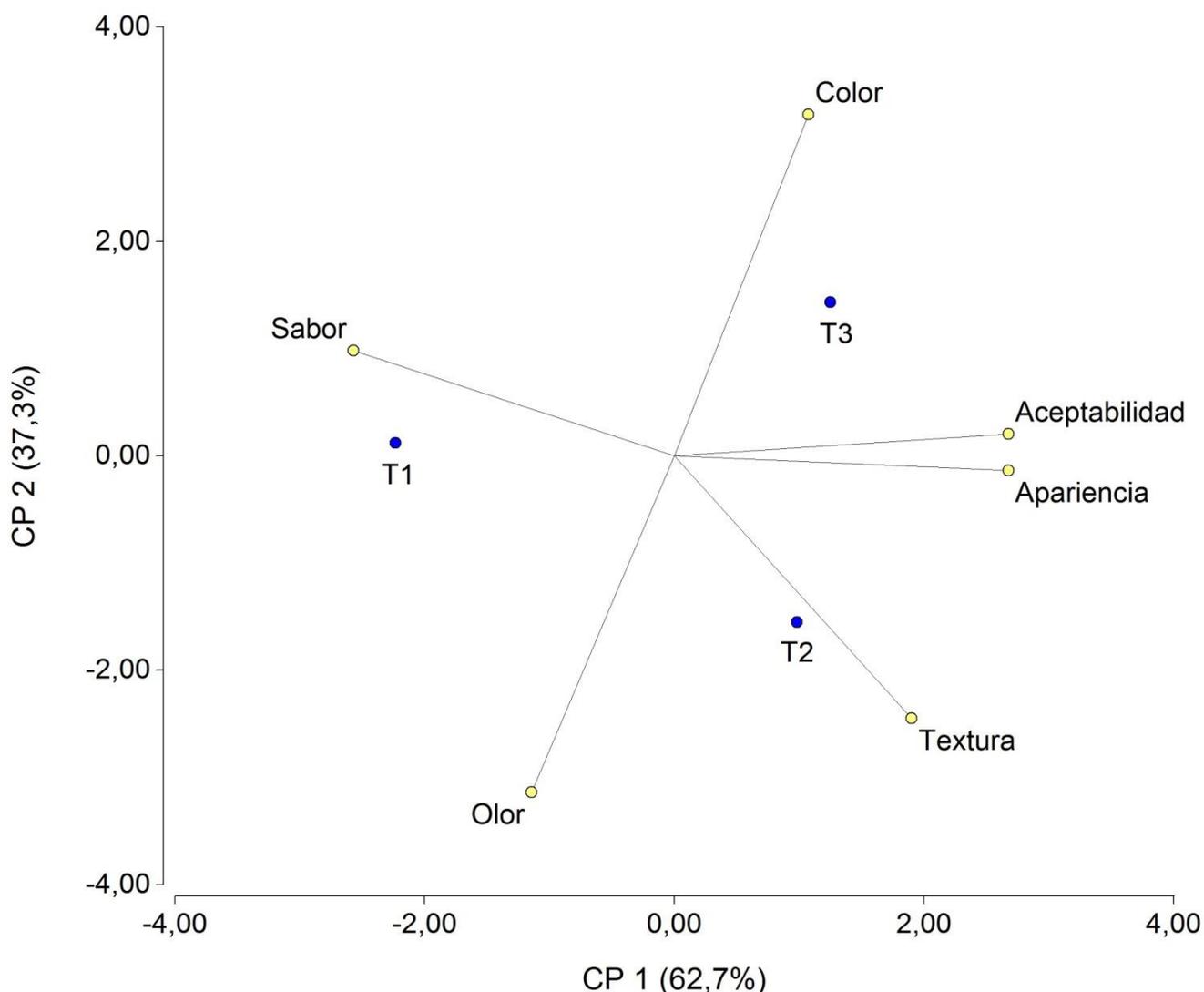


Figura 1: Análisis Biplot de atributos organolépticos de pasta de garbanzo elaborada con la Var. Norteño, con distintos tratamientos térmicos de conservación. (T1: esterilizado, T2: pasteurización, T3: sin tratamiento térmico)

En el gráfico Biplot referido a las características sensoriales evaluadas (**Figura 1**), se observa que la aceptabilidad, apariencia y sabor, fueron las características que mejor explicaron la variabilidad en las respuestas, siguiendo en importancia el color y olor. La pasta de garbanzo fresca sin tratamiento térmico de conservación fue la de mejor calificación en aceptabilidad y apariencia. Por el contrario, el material esterilizado fue la de menor valoración en su apariencia y aceptabilidad.

Para las características de apariencia y aceptabilidad se realizó una prueba de Friedman, donde se pudo observar que las pastas sin tratamiento y pasteurizada, alcanzaron una calificación en apariencia y aceptabilidad correspondiente a “me gusta moderadamente” mientras que la pasteurizada se diferenció de las anteriores al obtener una apreciación “me gusta levemente”.

CONCLUSIONES

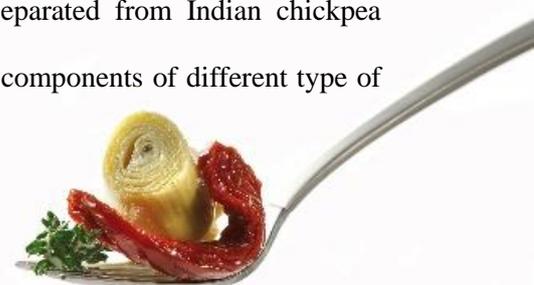
La elaboración de pasta de garbanzo a partir de granos que no son destinados a exportación resulta una alternativa a tener en cuenta al poder ser incorporada en la dieta aprovechando materia prima que no ingresa en las partidas exportables. Si bien la pasta puede ser consumida fresca, la implementación de métodos de conservación prolongarían su vida útil facilitando su producción en gran escala. De acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo, el tratamiento térmico de pasteurización impidió el desarrollo de



microorganismos aún después de 12 meses de elaboración y mantuvo las características organolépticas de la pasta de garbanzo sin tratamiento de acuerdo a lo manifestado por evaluadores experimentados. De esta manera se dispone de una técnica de conservación sencilla y económica que prolonga la vida útil del producto sin alterar su apariencia y aceptabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aharon S, Badani H, Galili L, Hovav R, Kapulnik Y, Shomer I, Galili S. 2011. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as Affected by Soaking and Cooking Conditions. *Food and Nutrition Sciences*. 2: 724-730.
- Ahmed Kenawi M. 2003. Chemical Composition, Nutritional Value, and In-Vitro Protein Digestibility of Three Traditional Breakfast Foods in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition* 58: 1- 6.
- Alimentos Argentinos, 2013. En <http://alimentoargentino.blogspot.com.ar/2013/06/>. Consultado el 30/07/2013
- Ashenafi M 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiol* 8:303–310.
- Ashenafi M and Busse M. 1991. Growth potential of *Salmonella Infantis* and *Escherichia coli* in fermenting tempeh made from horse bean, pea and chickpea and their inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *J. Sci. Food Agric.* 55:607–615.
- Brown KL 1994: Principios de la conservación mediante calor. En *Procesado Térmico y envasado de los alimentos*. Rees JAG y Bettinson J. Vol I. Zaragoza Editorial Acribia. pag.17-51.
- Cheftel J. C.; Cheftel H. and Besancon P. 1992: Cap. VII 1-3 Métodos de conservación , Tratamientos Físicos. Calor En Cheftel J. C.; Cheftel H. and Besancon P. *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Vol. II. Zaragoza Editorial Acribia. pag.236-256.
- Fundación mediterránea, 2013. En http://www.ieral.org/novedades_ver.asp?id_noticia=2315. Consultado el 23/04/16.
- García-Graells C, Masschalck B and Michiels CW. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J. Food Prot.* 62:1248–1254.
- Hedegaard RV, Kristensen D, Nielsen JH, Frøst MB, Østdal H, Hermansen JE, Kröger-Ohlson M and Skibsted LH. 2006. Comparison of descriptive sensory analysis and chemical analysis for oxidative changes in milk. *Journal of Dairy Science* 89: 495-504.
- ICMSF. 2000. *Microorganismos de los Alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas* Vol. 2. 454 pp. Editorial Acribia, Zaragoza (España)
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL
- Martínez M, Carreras J, Silva M, Marioli Nobile C, Aguilar R, Turco M, Badini R, Grosso R, Allende M, Badini R, Inga M y Span G. 2012. Garbanzo argentino de calidad en origen. Primer Congreso de Valor Agregado en Origen. 11° Curso Internacional de Agricultura de Precisión. Manfredi. Córdoba. En <http://inta.gob.ar/documentos/garbanzos-argentino-de-calidad-en-origen>.
- Minagri 2014. Informe de legumbres abril de 2014. Newsletter N° 76 abril 2014 http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro77/nl_legumbres.php
- Minagri 2016 en http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/indicadores/ofere-dem-int/2016/160225_Informe%20Mensual%20Estimaciones%20-%20Feb-2016.pdf
- Perkins W, Ashton D and Evancho G. 1975. Influence of the Z value of *Clostridium botulinum* on the accuracy of process calculations. *Journal of Food Science* 40: 1189-1192.
- Romero Baranzini A. L., M. R. Falcón Villa, J. M. Barrón Hoyos, M. I. Silveira Gramon, R.H. Alfaro Rodríguez, 2010. Evaluación de color del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) por métodos instrumentales y sensoriales. *Revista Mexicana de Agronegocios* XIV, 27: 323-325.
- Saleh AA and El-Adawy TA. 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 806–812
- Singh N, Sandhu KS and Kaur M. 2004. Characterization of starches separated from Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Journal of Food Engineering* 63: 441-449.
- Vasishtha H and RP. 2013. Effect of soaking and cooking on dietary fibre components of different type of chickpea genotypes. *J. Food Sci Technol.* Jun; 50(3): 579–584.



- Vijayakumari K, Siddhuraju P, Janardhanan K.1997. Effect of domestic processing on the levels of certain antinutrients in *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz seeds. *Food Chem.* 59: 367-371.
- Wood JA and Grusak MA. 2007. Nutritional value of Chickpea. En Yadav, S.S., R. Redden, W. Chen and B. Sharma (Ed.) *Chickpea Breeding and Management*.pag. 101-142
- Yamani MI and Al-DababsehBA. 1994. Microbial quality of hummus (chickpea dip) commercially produced in Jordan. *Journal of Food Protection* 57: 431 – 435.
- Yamani MI and Mehyar GF. 2011. Effect of Chemical Preservatives on the Shelf Life of Hummus during Different Storage Temperatures. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 7: 19-30.



Desarrollo de películas comestibles de metilcelulosa adicionadas con extracto de cáscara de manzana verde (*Granny Smith*) liofilizada

Matta E.¹, Urriza M.¹, Tavera-Quiroz M.J.², Bertola N.¹

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET, CIC, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina.

(2) Grupo de investigación en Desarrollo e Innovación de Procesos Alimentarios (DESINPA), Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.

e-mail: mattaeliana@gmail.com

RESUMEN

La manzana es una fuente importante de antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos, abundantes en la cáscara. En este trabajo se desarrollaron películas a base de metilcelulosa con la incorporación de extracto etanólico de cáscara de manzana verde liofilizada. Para la obtención de las películas, se prepararon soluciones de metilcelulosa al 1,5% (p/v) y diferentes volúmenes de extracto. Se realizaron determinaciones de contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante, tanto para el extracto como para las películas obtenidas por casting. Los extractos presentaron un alto contenido de polifenoles y una alta capacidad antioxidante. Además se determinaron propiedades mecánicas y térmicas de las películas. El agregado de extractos de cáscara de manzana verde en las películas de metilcelulosa permitió obtener un material biodegradable activo, el cual puede ser utilizado como recubrimiento sobre alimentos de humedad baja o intermedia.

Palabras claves: películas comestibles, recubrimientos, manzana, polifenoles.

ABSTRACT

The apple peel is an important antioxidants source mainly phenolics compounds. The aim of this work was to develop methylcellulose edible films with ethanolic extracts of lyophilized green apple peel. To obtain films, methylcellulose solutions 1.5% (w/v) with different volumes of extract were prepared. Determination of total polyphenol content and antioxidant activity in the extract and films were made. The extracts showed a high polyphenol content and high antioxidant capacity. An analysis of thermal and mechanical properties was carried out. The addition of extracts of green apple peel into methylcellulose films allowed to obtain an active biodegradable material, which can be used as coating on low or intermediate moisture foods.

Keywords: edible films, coatings, apple, polyphenols

INTRODUCCIÓN

En los últimos años gran número de investigaciones se han centrado en el desarrollo de nuevos recubrimientos y/o películas comestibles, basados en polímeros biodegradables (Arabestani, 2016; Romano y col., 2014). La tecnología del envasado activo está dirigido a ampliar la vida útil del producto, manteniendo su calidad nutricional y sensorial, así como la seguridad microbiológica (Cha y Chinnan, 2004). Los recubrimientos pueden consumirse con el alimento, extienden su vida útil ya que retardan la migración de humedad y de lípidos, así como el transporte de solutos y aromas, mejoran las características organolépticas, nutricionales y las propiedades mecánicas del alimento. Además, conservan la textura y permiten incorporar nutrientes y/o aditivos (Kester y Fennema, 1986). Actualmente se busca desarrollar recubrimientos y películas biodegradables con componentes bioactivos que permitan alargar la vida útil y mejorar la calidad de los productos retardando el deterioro de alimentos. Cada vez más consumidores optan por productos sin aditivos, por lo tanto estos componentes bioactivos deberán ser preferentemente componentes naturales.

La manzana es una fruta popular en todo el mundo y es una buena fuente de vitamina C como así también de fibra. Además, es una fuente de compuestos fenólicos, tales como ácido clorogénico, epicatequina, procianidina B2 y quercetina que contribuyen a un nivel relativamente alto de actividad antioxidante en comparación con otras frutas (Kim A-N y col., 2017.). Dependiendo de la variedad, la concentración de polifenoles en la cáscara de la manzana es al menos 3 veces superior a la presente en la pulpa de dicho fruto



(Karaman y col., 2012). Por lo tanto la cáscara de manzana, considerada como un desecho agro-industrial, constituye un recurso potencialmente aprovechable para la elaboración de extractos ricos en polifenoles destinados a ser utilizados como ingredientes funcionales.

El objetivo de este trabajo fue obtener películas comestibles activas a base de metilcelulosa con la incorporación de extracto de cáscara de manzana verde liofilizada, con el propósito de otorgarles actividad antioxidante a las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de extractos

Se trabajó con manzanas *Granny Smith*, las cuales fueron lavadas y peladas. Las cáscaras se colocaron en bandejas plásticas y se congelaron a -80°C por 24 hs. Luego se liofilizaron y una vez secas se molieron con molinillo de café obteniéndose un polvillo. Para la preparación del extracto etanólico liofilizado se agitó 1,5 gramos de cáscara liofilizada con 25 ml de etanol al 70% durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se filtró. Siguiendo el procedimiento anterior, también se obtuvieron extractos de cáscara de manzana verde liofilizada en medio acuoso.

Preparación de las películas

Para el desarrollo de las películas se utilizó como material formador de la matriz metilcelulosa A4M (Methocel, Dow Chemical Co, U.S.A) proporcionada por COLORCON S.A (Argentina) en una concentración de 1.5% (p/v) y se le agregaron distintas concentraciones de extractos (10, 20 y 25% v/v). Las películas se prepararon por moldeo y secado a 37°C . Como control se prepararon películas con 1,5% (p/v) de metilcelulosa sin agregado de extracto.

Caracterización del extracto

Determinación del contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se obtuvo a través del método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). El ensayo se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul, que puede ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. La técnica utilizada fue la de Massolo y col. (2011).

Determinación de actividad antioxidante

El análisis de la actividad antioxidante se llevó a cabo por el método de DPPH (Tavera-Quiroz y col., 2014). 100 μl del extracto obtenido a partir de la cáscara de manzana se mezclaron con 3,9 ml de DPPH disuelto en etanol al 96%. La mezcla se homogeneizó cuidadosamente y se dejó reaccionar durante 60 min en la oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm. Se midió además la absorbancia del reactivo sin muestra. Los resultados obtenidos se expresaron como % de inhibición del radical DPPH (I%) (**Ecuación 1**). Por diferencia de absorbancia (antes y después de la reacción) se determinó el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración de 25 mg/L.

$$I (\text{DPPH}) = ((\text{Abs reactivo} - \text{Abs reacción}) / (\text{Abs reactivo})) * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Caracterización de las películas obtenidas

Determinación de la capacidad antioxidante total (TAC) y contenido de polifenoles de las películas

Para la determinación de la capacidad antioxidante total y contenido de polifenoles de la película se disolvió 1g de la misma en 50 ml de agua destilada. Una alícuota de 100 μl de la solución obtenida se utilizó para determinar la capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante se determinó por triplicado a través del método de DPPH. El contenido de polifenoles se obtuvo por el método de Folin-Ciocalteu y los resultados se expresaron como $\text{mg ácido clorogénico}/100\text{g}_{\text{ss}}$.

Determinación del contenido de humedad

Se determinó el contenido de humedad de las películas mediante el método de secado en estufa a 105°C hasta peso constante.

Determinación del porcentaje de material soluble

Se llevó a cabo el ensayo de solubilidad mediante la técnica propuesta por Rivero y col., (2010). De cada formulación de película se cortaron cuadrados de 4 cm^2 , los cuales se pesaron y se agitaron con 80 ml de agua destilada durante 1 hora. Luego las películas se secaron en estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1$, y el porcentaje de material soluble se calculó teniendo en cuenta el peso seco inicial de la película.



Ensayo de permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua se midió utilizando el método ASTM E96 con algunas modificaciones. Las películas una vez secas se acondicionaron en ambiente de humedad relativa del 65% y 20°C, durante 48 hs antes de las determinaciones de permeabilidad. Las muestras se colocaron en celdas de área conocida, las cuales contenían gel de sílice y posteriormente fueron llevadas a recipientes acondicionados a una humedad relativa del 75% a 20°C. Se registraron los cambios de peso en función del tiempo. La tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR, g s⁻¹ m⁻²) se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida de los cambios de peso en función del tiempo por regresión lineal; la permeancia (g Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²) se determinó como la WVTR dividida por el gradiente de presión parcial del vapor a través de la película. La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se calculó como el producto de los valores de permeancia y espesor de la película y se expresó como g Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹.

Determinación de las propiedades microestructurales mediante FTIR

La espectroscopia de infrarrojo (IR) es una de las técnicas analíticas más importantes y utilizadas debido a que puede emplearse para establecer la identidad de un compuesto. Esta técnica se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando ésta sea igual a la necesaria para que la molécula comience a vibrar. Cada grupo funcional tiene un modo de absorción característico que se presenta en el espectro como un pico o banda, debido a que todas las moléculas tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro infrarrojo. Los espectros FTIR de las películas se registraron en un equipo Nicolet IS10 entre 4000 a 400 cm⁻¹.

Determinación de las propiedades mecánicas de las películas

Se realizaron ensayos de tracción en un equipo DMA TA Instruments Q800 (TA Instruments, New Castle, EE.UU.). Las películas se cortaron con una geometría rectangular (30 mm de longitud y 6 mm de ancho). Se realizaron ensayos para determinar las propiedades mecánicas de las diferentes películas. Las curvas de tensión-deformación se obtuvieron con una rampa de fuerza a velocidad de deformación constante de 0,3 N/min hasta alcanzar una fuerza estática de 18N o hasta la ruptura de la muestra.

Determinación de las propiedades térmicas de las películas

Las propiedades térmicas de las películas se determinaron mediante el uso de un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) Q100 (TA Instruments, New Castle, EE.UU.). El equipo es controlado por un módulo TA 5000 con un sistema de enfriamiento a base de N₂, con un caudal de 20 ml/min. Se pesaron aproximadamente 5-6 mg de muestra en una balanza electrónica de precisión en cápsulas de aluminio y luego estas se sellaron herméticamente. Se hicieron corridas por duplicado de las muestras de las películas con diferentes concentraciones de extractos, utilizando una cápsula de aluminio vacía como referencia.

El ensayo se realizó como se describe en Tavera-Quiroz y col. (2012). El primer barrido se realizó desde -70 hasta 200°C. Seguidamente la muestra se enfrió a una velocidad de 20°C/min hasta -70°C y se realizó un segundo barrido entre -70 y 250°C. Se utilizó calorimetría diferencial de barrido modulada para obtener los termogramas a partir de los cuales se obtuvo la temperatura de transición vítrea (T_g) utilizando el software Universal Analysis 2000 V1.7 F (TA Instruments, New Castle, EE.UU.).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) para evaluar el efecto de los factores analizados utilizando el programa Infostat v2009 (Córdoba, Argentina). Para los ensayos de comparación de medias se empleó el test de menor diferencia significativa (LSD) con $P > 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del extracto etanólico de cáscara de manzana verde liofilizada

El extracto etanólico de cáscara de manzana verde liofilizada (EE) mostró un contenido de polifenoles de 850 mg_{ac clorogénico}/100g_{ms}; en cambio el extracto acuoso (EA) exhibió una cantidad menor de compuestos polifenólicos (510,2 mg_{ac clorogénico}/100g_{ms}). Por este motivo se trabajó con el extracto etanólico para la formación de películas y se descartó el uso de extractos acuosos, ya que la extracción en etanol 70% fue mayor debido a su menor polaridad respecto al agua.

Con los mismos extractos elaborados para determinar el contenido de compuestos fenólicos, se determinó la capacidad antioxidante. El porcentaje de inhibición del extracto fue del 83%.



Caracterización de las películas

Los espectros obtenidos por FTIR para las películas con EE (**Figura 1**) muestran la aparición de una banda alrededor de 1724 cm⁻¹. Esta banda es característica de los grupos carbonilos como los ácidos carboxílicos y ésteres, como el caso del ácido cítrico presente en la manzana.

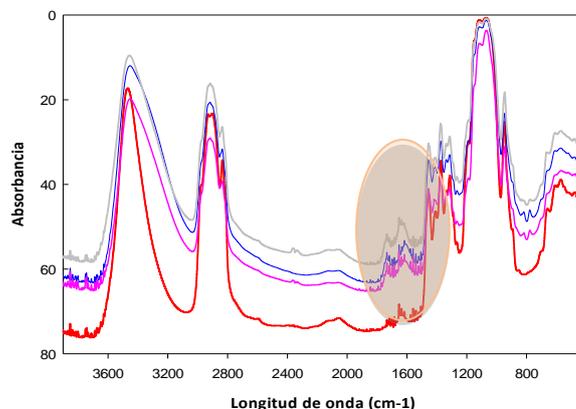


Figura 1. Espectros de FTIR de las películas formuladas con 10, 20 y 25% EEL.

La incorporación del extracto etanólico de cáscara de manzana en las películas tuvo un efecto significativo sobre la humedad y la solubilidad (**Tabla 1**). Se observó que al aumentar la concentración de EE de 10 a 20% en la elaboración de las películas aumentó la humedad y disminuyó la solubilidad de las mismas. Sin embargo, un aumento de la concentración de EE al 25% no produjo variaciones significativas sobre sus valores.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las películas preparadas con distintas concentraciones de polvo liofilizado de cáscara de manzana.

EE (%)	Humedad (%)	WVP x10 ¹¹ (g Pa ⁻¹ m ⁻¹ s ⁻¹)	Solubilidad (%)
0	10,3 ^a	8,7 ^c	93,8 ^c
10	22,9 ^b	7,6 ^b	36,3 ^b
20	26,4 ^c	6,3 ^a	25,9 ^a
25	27,7 ^c	6,5 ^a	29,4 ^a

158

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias significativas

Un papel importante de los recubrimientos comestibles es reducir el intercambio de agua entre el producto y el medio ambiente o entre ingredientes de un sistema alimenticio heterogéneo que por ejemplo tengan distintos contenidos de humedad que se quieran mantener inalterados durante el almacenamiento (Talens y col., 2012). La permeabilidad al vapor de agua de una película depende de la estructura química y la naturaleza del permeante, y la temperatura del medio ambiente. A partir de los resultados obtenidos se observó que la permeabilidad al vapor de agua (WVP) disminuyó con la incorporación del EE, alcanzando los menores valores con una concentración de 20% de EE, un aumento de la concentración del extracto a 25% no produjo efecto significativo sobre la WVP.

Según Mancini et al, (1999) y Del Nobile y col. (2007) un modelo matemático capaz de describir toda la curva de tensión-deformación es el presentado en la **ecuación 2**. Donde ϵ_T es la deformación verdadera, σ_T es el esfuerzo verdadero, E_C (MPa) es el módulo elástico (tangente a la curva tensión-deformación en el origen) y K es una constante que permite ajustar el modelo.

$$\sigma_T(\epsilon_T) = E_C \epsilon_T \exp(\epsilon_T K) \quad \text{Ec. 2}$$



En la **Tabla 2** se presentan los valores del módulo elástico, obtenido a partir de la ecuación anterior, y la elongación máxima obtenida para todas las muestras ensayadas. El agregado de EE disminuyó los valores de modulo elástico y la elongación máxima de las películas de metilcelulosa (MC), sin embargo no hubo efecto de la concentración de EE utilizada.

Así mismo se observó un corrimiento a valores menores de la temperatura de transición vítrea obtenida por DSC, respecto de las películas de MC sin extracto.

Tabla 2. Propiedades mecánicas y térmicas de las películas con EEL

EE (%)	Módulo Elástico (Ec, MPa)	Elongación (%)	Tg (°C)
0	3751 ^b	9,3 ^c	190 ^b
10	1674 ^a	2,9 ^b	171 ^a
20	2036 ^a	2,8 ^b	172 ^a
25	1917 ^a	2.0 ^a	165 ^a

^{a,b,c} *Letras diferentes indican diferencias significativas*

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó una formulación con una concentración de 20% de extracto etanólico de cáscara de manzana verde liofilizada ya que esta concentración presentó bajos valores de la permeabilidad al vapor de agua.

Se determinó el contenido de polifenoles totales de las películas con agregado de 20% de EE ya que a altas concentraciones de EE se obtuvieron menores valores de permeabilidad al vapor de agua y una concentración mayor produciría un detrimento en las propiedades mecánicas por la mayor disminución de la elongación máxima. Se obtuvo un contenido de polifenoles de 11,62 mg ác clorogénico/g película, y en cuanto a la capacidad antioxidante se obtuvo un porcentaje de inhibición del 20%.

CONCLUSIONES

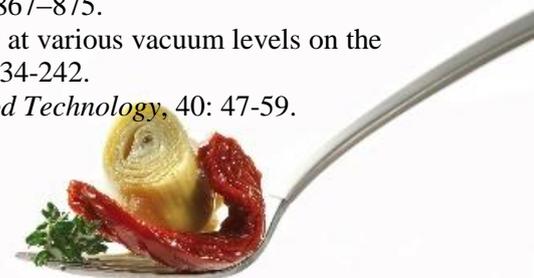
Se logró obtener un ingrediente activo y funcional a partir de los desechos de la cáscara de manzana verde con propiedades antioxidantes y como fuente de polifenoles. Este ingrediente puede ser agregado en matrices de hidrocoloides y utilizarlo en posibles aplicaciones en alimentos.

La formulación de películas comestibles con extractos etanólicos de cáscara liofilizada es una buena alternativa para obtener un material activo, con buenas propiedades de barrera y mecánicas, sin aportar plastificantes a la matriz que generen corrimientos importantes de la temperatura de transición vítrea del material.

La formulación de películas comestibles con ingredientes no convencionales se convierte en una estrategia para utilizar subproductos agroindustriales que aporten nutrientes y permitan desarrollar nuevos tipos de coberturas para ser utilizadas en alimentos funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Arabestani, A.; Kadivar, M.; Shahedi, M.; Hossein Goli, S.A.; Porta R. (2016). Characterization and antioxidant activity of bitter vetch protein-based films containing pomegranate juice. *Food Science and Technology*, 74: 77-83
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*. 28: 25-30.
- Cha, D. S. y Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer based antimicrobial packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 223-237.
- Karaman, S.; Tütem, E.; Baskan, K.S.; Apak, R. (2012). Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *J Sci. Food Agric.*, 93: 867–875.
- Kim, A.N.; Kim, H.-J.; Kerr, W.L.; Choi, S.-G. (2017). The effect of grinding at various vacuum levels on the color, phenolics, and antioxidant properties of apple. *Food Chemistry*. 216: 234-242.
- Kester, J.J., Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, 40: 47-59.



Massolo, J.F.; Concellón, A.; Chavez, A.R.; Vicente, Ariel R. (2011). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 59 10–15

Rivero, S.; García, M.A.; Pinotti, A. (2010). Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. *Carbohydrate Polymers* 82: 270–276

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology. Oxidants and Antioxidants Part A*, 299, 152–178.

Talens, P.; Pérez-Masía, R.; Fabra, M.J.; Vargas, M.; Chiralt, A. (2012). Application of edible coatings to partially dehydrated pineapple for use in fruit–cereal products. *Journal of Food Engineering*, 112: 86–93

Tavera Quiroz, M.J.; N. Bertola, A. Pinotti. (2012). Efecto del agregado de ácido cítrico como agente entrecruzante en películas a base de metilcelulosa. IV Jornadas Internacionales sobre avances en la tecnología de películas y coberturas funcionales en alimentos. *Agrobioenvases 2012*.

Tavera-Quiroz, M. J., Lecot, J., Bertola, N., & Pinotti, A. (2013). Stability of methylcellulose based films after being subjected to different conservation and processing temperatures. *Materials Science and Engineering: C*, 33: 2918–2925.

Tavera-Quiroz, M.J.; Urriza M; Pinotti, A.; Bertola, N. (2014). Development and Characterization of a Baked Snack from Rings of Green Apples. *Food Bioprocess Technol* DOI 10.1007/s11947-014-1310-



Efecto del lavado por aspersión en la calidad de frutillas mínimamente procesadas
Méndez Galarraga M.P., Salsi M.S., Piagentini A.M., Pirovani M.E.

Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
galarragapaula@gmail.com

RESUMEN

El lavado-desinfección con sanitizantes es esencial para reducir la carga microbiana, pero el efecto oxidante de los mismos pueden ocasionar la pérdida de los compuestos bioactivos. El objetivo de este trabajo fue estudiar y modelar el lavado-desinfección con ácido peracético (APA) por aspersión de frutillas cortadas, variando concentración (C: ppm) y tiempo de aspersión (t: seg). Las respuestas fueron: reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT), mohos (MH) y levaduras (LEV); retención de fenoles totales (FT), antocianinas totales (AT) y capacidad antioxidante (CA), referidas a la materia prima. Estas respuestas se evaluaron inmediatamente después del procesamiento (0d) y luego de 7 d de almacenamiento a 2°C (7d). Al 0d, AMT y MH pudieron modelarse en función de las variables de proceso, pero las mismas no se vieron afectadas luego del almacenamiento. En cambio, LEV pudo modelarse tanto en el 0d como después de 7 días. FT, AT y CA no fueron afectadas por C y t. El lavado por aspersión en el rango ensayado permite lograr un producto con retenciones de compuestos bioactivos superiores al 79%, y optimizar la desinfección basado en los modelos de reducción microbiológica.

Palabras clave: frutillas, compuestos bioactivos, calidad microbiológica.

ABSTRACT

Washing-disinfection sanitizers are essential to reduce the microbial load, but the oxidizing effect may result in the loss of bioactive compounds. The aim of this work was to study and model the washing-disinfection by spraying with peracetic acid (PAA) on fresh cut strawberries. Total mesophilic microbial (AMT), moulds (MH) and yeast (LEV) count reduction; and total phenolics (FT), total anthocianins (AT) and antioxidant capacity retention were modeled as a function of concentration of PAA (C) and time (t). Packaged samples were evaluated immediately after processing (0 d) and after 7 d of storage at 2°C (7 d). At 0d, AMT and MH increased with C, but these were not affected by C and t after storage. Instead, LEV increased with C at 0d and 7 days. FT, CA and AT were unaffected by C and t. The average retention of each one at 0d was higher than 79% and no changes were found after 7 d. Spray washing-disinfection could be optimized based only on microbiological reduction models.

Keyword: strawberries, bioactive compounds, microbiological quality

INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas frescas son una parte fundamental de la dieta en la población mundial, contribuyendo al aporte de vitaminas, minerales, fibra y compuestos bioactivos (antioxidantes). En particular, las frutillas son frutas de consumo popular con atractivo color, sabor y aroma (da Silva Pinto, et al. 2008) y pueden ser consumidas frescas, lo cual representa una ventaja para los consumidores debido a que se producen menores pérdidas de nutrientes (vitamina C, folato y compuestos fenólicos) que cuando se realiza algún procesamiento tradicional como por ejemplo, deshidratación, tratamientos térmicos, y otros. Sin embargo, la dificultad es que estas frutas poseen una vida postcosecha extremadamente corta, son susceptibles al daño mecánico, deterioro fisiológico y microbiológico y a la pérdida de agua (Terefe, et al. 2009).

Las frutas frescas listas para consumir se han convertido en un área importante de potencial crecimiento en la industria, probablemente debido, en parte, a sus características de frescura, bajo contenido calórico y como respuesta a la demanda de los consumidores que requieren productos saludables. Sin embargo, es bien sabido que el procesado mínimo altera la integridad de las frutas e induce el aumento de respiración de los tejidos, lo que conduce a deterioros bioquímicos, como amarronamiento, desarrollo de *off-flavour*, cambios en la textura y en el contenido de compuestos bioactivos, provocando pérdidas en la calidad de la fruta fresca



cortada (Martín-Belloso et al. 2006). El mínimo procesamiento incluye tecnologías para procesar tanto frutas como hortalizas modificando levemente sus características de frescas, garantizando su seguridad o inocuidad. El concepto de productos procesados en fresco está basado en que durante su preparación, los tratamientos aplicados no deberían producir cambios en su calidad y, si ocurren, deberían ser mínimos, en particular en sus características nutritivas y sensoriales. Los tratamientos aplicados en estos productos son métodos simples, que incluyen acondicionamiento, pelado, cortado, lavado-desinfección, baños o *dippings* con agentes químicos (antioxidantes y/o antimicrobianos) y finalmente, envasado en recipientes con atmósferas modificadas y almacenado a bajas temperaturas (2-4°C) a fin de aumentar la vida útil del producto (Allende, et al. 2006).

La sanitización con compuestos químicos es ampliamente usada en la industria para reducir la carga microbiana en vegetales. Por razones económicas, el hipoclorito de sodio (NaClO) es el más usado, aunque tiene como desventaja la formación de trihalometanos, que son compuestos cancerígenos (Ölmez and Kretschmar, 2009). Por esto, ha empezado a surgir el interés por buscar alternativas para minimizar o reemplazar este sanitizante (Biazotto Bachelli, et al. 2013). El ácido peracético (APA) es usado principalmente como desinfectante en plantas industriales (Kitis, 2004). Su uso en la industria de los vegetales frescos cortados sería un avance concreto en la búsqueda de tecnologías “limpias” ya que no causa la formación de compuestos halogenados cancerígenos y sus productos de descomposición son ácido acético, agua y oxígeno, es decir compuestos ecológicamente seguros (Hilgren, et al. 2007; Vandekinderen, et al. 2009). Las formas habituales de aplicar el sanitizante son por inmersión o aspersión. Van de Velde, et al. (2014) han estudiado la operación de lavado-desinfección por inmersión de frutillas cortadas con solución de APA y desarrollaron modelos predictivos que permitieron encontrar las condiciones de proceso que maximizan la calidad microbiológica y minimizan la pérdida de compuestos bioactivos y calidad nutricional, evaluadas a través del contenido de ácido ascórbico. Según este estudio, la calidad sensorial y el contenido de compuestos bioactivos se vieron reducidos entre un 10 y un 37% por el tratamiento, ya que durante esta operación por inmersión se pierden pigmentos, vitaminas y otros compuestos por oxidación, por lixiviación o por ambas en simultáneo.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del lavado-desinfección por aspersión con soluciones de ácido peracético en función de la concentración del agente activo y tiempo de exposición sobre la calidad microbiológica y el potencial saludable (contenido de fenoles, antocianinas y capacidad antioxidante) de frutillas cortadas en cuartos inmediatamente después de realizar la operación y luego de 7 días de almacenamiento a 2°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal utilizado

Se utilizaron frutillas (*Fragaria x Ananassa* Duch), cultivar ‘Camarosa’, oriundas de Arroyo Leyes, Santa Fe, Argentina, con un 90-100% de superficie de color rojo.

Acondicionamiento del material vegetal

Las frutas fueron inspeccionadas, eliminando aquellas con signos de podredumbre, como así también los cálices y pedúnculos. Se realizó un pre-lavado con agua de red fluyendo por 2 min y un posterior escurrido por gravedad sobre papel absorbente.

Procesamiento para la obtención de frutillas frescas cortadas

Las frutillas fueron procesadas en la “zona limpia” de la planta piloto del Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL. Se cortaron manualmente, con cuchillo de acero inoxidable de hoja lisa, realizando cortes longitudinales en cuartos. Luego se realizó la etapa de lavado-desinfección, donde 200 g de frutillas cortadas fueron lavadas según lo establecido por el diseño experimental, variando la concentración de APA y el tiempo de aspersión. Finalmente, la mitad de las frutillas lavadas en cada corrida experimental se utilizaron para los análisis en el día de procesamiento y la otra mitad fue almacenada en envases de tereftalato de polietileno (PET) en cámara a 2°C por 7 días y posteriormente utilizadas para los análisis en este momento. Paralelamente, frutillas (100 g) enteras sin procesar se analizaron en el día de procesamiento (control día cero). Una cantidad equivalente se conservaron en idénticas condiciones a las muestras lavadas durante 7 días y se analizaron en ese momento (control día 7).

Diseño experimental

Para este estudio se aplicó un Diseño Central Compuesto de 11 corridas experimentales, que incluye valores de las variables independientes en 5 niveles, utilizando rangos desde 11-138 seg para el tiempo (t) de



aspersión y de 1-240 ppm para la concentración (C) del agente activo. Se supuso que existía un modelo polinomial de segundo orden para representar cada una de las respuestas, cuya ecuación general es la siguiente:

$$Y(C,t)=a + bC + ct+ dCt + eC^2+ft^2$$

Las respuestas estudiadas fueron:

Retención de fenoles totales, FT_i (% con respecto al control)

Retención de antocianinas totales, AT_i (% con respecto al control)

Retención de capacidad antioxidante, CA_i (% con respecto al control)

Reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales, AMT_i (-log₁₀N/Nc)

Reducción de mohos, MH_i (-log₁₀N/Nc)

Reducción de levaduras, LEV_i (-log₁₀N/Nc)

Donde N es el recuento de microorganismos viables de las muestras lavadas por aspersión y Nc es el recuento de las muestras control (sin lavar); i es el día de análisis, 0 o 7.

Recuento de microorganismos

Cada muestra (10 g) fue colocada en 90 ml de agua de peptona al 0,1%, en una bolsa estéril. Luego, el contenido fue homogeneizado en *stomacher* durante 1 minuto. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales, preparadas en agua de peptona estéril para las determinaciones microbiológicas, por triplicado. El total de los organismos viables (microorganismos aerobios mesófilos), fueron determinados mediante el método de recuento en placa PCA (30°C, 48 h). Para mohos y levaduras se realizó un recuento en placa con medio YGC (25°C, 3-5 días). De igual manera se procedió con las muestras almacenadas a 2°C durante 7 días.

Obtención de los extractos

Cinco gramos de fruta se homogeneizaron con 75ml de acetona/agua (80:20), se sonicaron en un lavador ultrasónico (Testlab), durante 10 minutos; luego la mezcla se centrifugó a 12.000g durante 20 minutos a 4°C con una centrífuga refrigerada Heal Force. El sobrenadante fue separado y usado para los análisis correspondientes.

Técnicas de análisis

Fenoles totales: La determinación de fenoles totales se llevó a cabo usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). A 0,125 mL de extracto se agregaron 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reaccionar durante 3 minutos. Luego se adicionó 0,5 mL de solución saturada de carbonato de sodio y se completó a 5 mL con agua destilada. Se agitó vigorosamente, se dejó reaccionar durante 25 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 4000g. Los blancos de reacción se prepararon reemplazando el volumen de muestra por solución de extracción. Se midió la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (UV-Visible Genesys 10S. Thermo Scientific). Se construyó una curva de calibrado de ácido gálico (AG) en el rango de concentraciones 2-10 mg AG 100 mL⁻¹. Las determinaciones se realizaron por triplicado en cada muestra de frutilla y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente por 100 g de fruta fresca (mg AG 100g⁻¹ FF).

Antocianinas totales: El contenido de antocianinas totales se determinó con el método de pH diferencial de acuerdo a Jin-Heo y Yong-Lee (2005). Alícuotas de extracto se ajustaron a pH 1 con una solución 0,1 mol L⁻¹ de cloruro de potasio y a pH 4,5 usando una solución buffer 25 mmol L⁻¹ de ácido acético/acetato de sodio. Se midieron las absorbancias a 510 y 700 nm en espectrofotómetro (UV-Visible Genesys 10S. Thermo Scientific), y los resultados se convirtieron en mg pelargonidin-3-glicósido 100 g⁻¹ de fruta fresca, (mg P3G 100 g⁻¹ FF), usando un coeficiente de extinción molar de 22.400 L (mol cm)⁻¹, una masa molecular de 432,2 g mol⁻¹, un camino óptico de 1 cm y una absorbancia (A), según ecuación (1):

$$A=[(A_{510}-A_{700})_{pH1}-(A_{510}-A_{700})_{pH4.5}] \quad (1)$$

Donde, A₅₁₀ y A₇₀₀ son las medidas de absorbancia a pH 1 y 4,5. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Capacidad antioxidante: La capacidad antioxidante de las muestras se midió de acuerdo a Sánchez-Moreno et al., (2003). La actividad antirradicalaria se cuantificó por la medida de la disminución de la absorbancia de una solución metanólica del radical libre DPPH* (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a 517 nm en presencia de alícuotas del extracto de la fruta. La concentración inicial de DPPH* fue de 0,03 g L⁻¹ y las medidas de



absorbancia se tomaron en espectrofotómetro (UV-Visible Genesys 10S. Thermo Scientific). Los cálculos se realizaron de acuerdo a la ecuación (2):

$$\% \text{DPPH}^*_{\text{remanente}} = [A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}] \times 100 \quad (2)$$

En donde A_{control} es la absorbancia de 3,9 mL de solución de DPPH* adicionado de un volumen de metanol igual al volumen de muestra agregado en el tubo correspondiente y A_{muestra} es la absorbancia de 3,9 mL de DPPH* adicionado con un volumen entre 0,025 y 0,075 mL de extracto. Se calculó el IC_{50} (muestra) definido como la cantidad de muestra en 1 mL de reacción necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH*, obtenida de la gráfica de porcentaje de DPPH* remanente vs. concentración (mg de fruta mL^{-1} de reacción).

Los análisis se realizaron por triplicado y las lecturas se tomaron luego de dejar reaccionar las muestras durante 120 minutos.

Los resultados se expresaron como la capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AEAC) (Lim, et al. 2007), según ecuación (3):

$$\text{AEAC (mgAA/100g de fruta fresca)} = \text{IC}_{50(\text{AA})} / \text{IC}_{50(\text{muestra})} \times 10 \quad (3)$$

Donde: $\text{IC}_{50(\text{AA})}$ es la cantidad de ácido ascórbico (AA) en 1 mL de reacción necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH*, obtenida de la gráfica de % DPPH* remanente vs. concentración (mg de AA mL^{-1} reacción).

Para calcular el $\text{IC}_{50(\text{AA})}$ se preparó una curva de calibrado de AA (0 - 0,207 mg mL^{-1}). La curva se realizó por triplicado y se calculó el valor de $\text{IC}_{50(\text{AA})} = 0,00404$ mg mL^{-1} .

Análisis estadístico

El programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.) se usó para realizar el ANOVA, y ajustar las ecuaciones de segundo orden a los datos experimentales y obtener los coeficientes de regresión de los modelos. También se comprobó la idoneidad de los modelos a través de la falta de ajuste y el coeficiente de determinación (R^2). En el ANOVA, la significancia de cada término se evaluó referida al error puro y se eliminaron los términos del modelo no significativos. Se usó el programa Microsoft Excel® para calcular los valores de las medias y desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales obtenidos para AMT, MH y LEV bajo las condiciones del diseño experimental se presentan en la **Tabla 1**.

Los análisis de los residuos ($Y_{\text{experimental}} - Y_{\text{predicho}}$) para cada respuesta muestran que se cumplen los supuestos de normalidad, independencia y aleatoriedad. Los coeficientes de determinación (R^2) de los modelos fueron satisfactorios y no hubo falta de ajuste ($p > 0,05$), por lo tanto los mismos fueron aceptados.

El recuento inicial promedio de microorganismos aerobios mesófilos totales de las frutillas (control día 0) fue de 3,3 $\log\text{UFCg}^{-1}$; el de mohos y levaduras fue de 3,65 y 3,60 $\log\text{UFCg}^{-1}$, respectivamente. Luego de 7 días de almacenamiento, no se observaron cambios en el recuento de las frutillas (control día 7)



Tabla1. Resultados experimentales de las reducciones microbiológicas en frutillas lavadas por aspersión con APA al día 0 y 7.

Corrida	Concentración (ppm)	tiempo (s)	i (día)	AMT _i (-log ₁₀ Ni/Nci)	MH _i (-log ₁₀ Ni/Nci)	LEV _i (-log ₁₀ Ni/Nci)
1	120,5	74,5	0	1,16	1,91	2,30
			7	1,65	2,41	2,48
2	240	74,5	0	1,15	2,48	3,60
			7	1,82	2,41	2,57
3	205	119,4	0	1,30	1,84	2,20
			7	1,12	3,59	2,70
4	120,5	11	0	0,75	0,59	0,73
			7	1,61	1,59	1,56
5	36	29,6	0	0,22	0,52	0,95
			7	1,48	1,41	1,50
6	120,5	74,5	0	1,07	2,26	2,30
			7	1,78	1,84	1,94
7	36	119,4	0	0,70	0,26	1,36
			7	1,33	1,25	0,49
8	205	29,6	0	0,94	1,91	2,43
			7	1,95	2,41	2,22
9	120,5	138	0	1,15	2,00	2,18
			7	1,58	2,05	2,00
10	120,5	74,5	0	1,20	1,51	1,95
			7	1,30	1,26	1,41
11	1	74,5	0	0,43	1,40	1,19
			7	0,86	2,19	1,50

AMT_i: Reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales al día i; MH_i: reducción de mohos al día i; LEV_i: reducción de levaduras al día i. Ni es el recuento de microorganismos viables de las muestras lavadas por aspersión al día i; Nci es el recuento de las muestras control (sin lavar) al día i. i es el día de análisis, 0 o 7.

El modelo AMT resultó función de la concentración del sanitizante y el tiempo de aspersión a través de los términos lineales y cuadráticos ($p \leq 0,05$) en el día 0. Según el diagrama de Pareto (no se muestra), la concentración tiene más efecto que los otros términos y afecta positivamente la respuesta (**Fig. 1**). El modelo AMT₀ reducido se muestra en la ecuación (4); el máximo valor predicho por el modelo es 1,32 logUFCg⁻¹ a 183 ppm y 109 seg. Van de Velde (2012) evaluó el lavado-desinfección por inmersión de frutillas frescas cortadas con ácido peracético a una concentración de 100 ppm y 120 seg, obteniendo una reducción de aerobios mesófilos totales de 2,1 log UFCg⁻¹. En las mismas condiciones, pero con lavado por aspersión, la reducción fue menor (1,1 log UFCg⁻¹). Las diferencias en el comportamiento en las reducciones de microorganismos aerobios mesófilos totales frente al sanitizante está condicionado por varios factores, tales como las condiciones de lavado, la superficie de la fruta, la presencia de sitios de difícil acceso para el sanitizante, la formación de biofilms, la internalización de las bacterias dentro del producto, entre otros (Sapers 2001; Yu et al. 2001).

$$AMT_0 = -0,29 + 0,01C + 0,012t - 2,7 \times 10^{-5}C^2 - 5,7 \times 10^{-5}t^2 \quad (4)$$



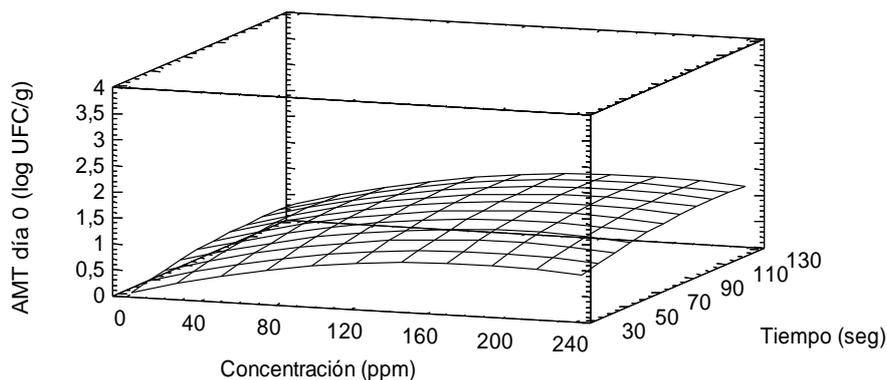


Fig. 1. Gráfico de superficie respuesta para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) en el día 0.

A los 7 días de almacenamiento, el ANOVA del modelo predictivo de la reducción de los microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT_7) indicó que ningún término del mismo fue significativo. En función de ello, se estimó que en el espacio experimental ensayado la reducción promedio de microorganismos aerobios mesófilos totales todas las corridas experimentales, fue de $1,5 \log UFCg^{-1}$. En la **Tabla 1** se puede observar que, en general, las reducciones son mayores en el día 7 que en el día inicial de procesamiento y dado que la carga microbiana del control no mostró diferencias con el día 0 se puede inferir que la carga microbiana en las frutillas lavadas sigue disminuyendo (posible efecto residual del APA) durante el almacenamiento refrigerado ($2^\circ C$).

El modelo MH_0 resultó función de la concentración del sanitizante (término lineal), mientras que LEV_0 se vio afectado tanto por la concentración de APA (término lineal) como por el tiempo de aspersión (término cuadrático) ($p \leq 0,05$). Los modelos reducidos se muestran en las ecuaciones (5) y (6).

$$MH_0 = 0,71 + 6,6 \times 10^{-3}C \quad (5)$$

$$LEV_0 = -0,43 + 8,5 \times 10^{-3}C + 3,8 \times 10^{-2}t - 2,12 \times 10^{-4}t^2 \quad (6)$$

Los máximos valores predichos de MH_0 y LEV_0 usando los modelos reducidos fueron, 2,31 (240 ppm y 74,5seg) y 3,29 (240 ppm y 90 seg) $\log UFCg^{-1}$, respectivamente (**Fig. 2** y **3**). Según el diagrama de Pareto (no se muestra) la concentración del sanitizante (APA) afecta mucho más la respuesta que el tiempo de aspersión. Rodgers et al. (2004) evaluaron la reducción de mohos y levaduras en frutillas enteras con 80 ppm de APA y 5 minutos de lavado por inmersión y obtuvieron reducciones de alrededor de $1 \log UFCg^{-1}$.

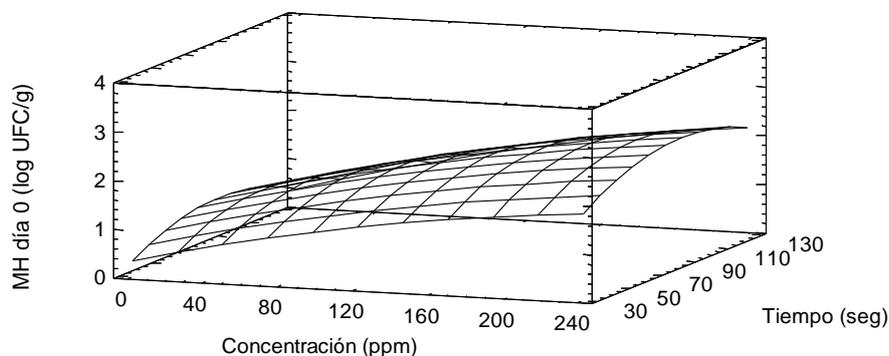


Fig. 2. Gráfico de superficie respuesta para la reducción de mohos (MH) en el día 0.



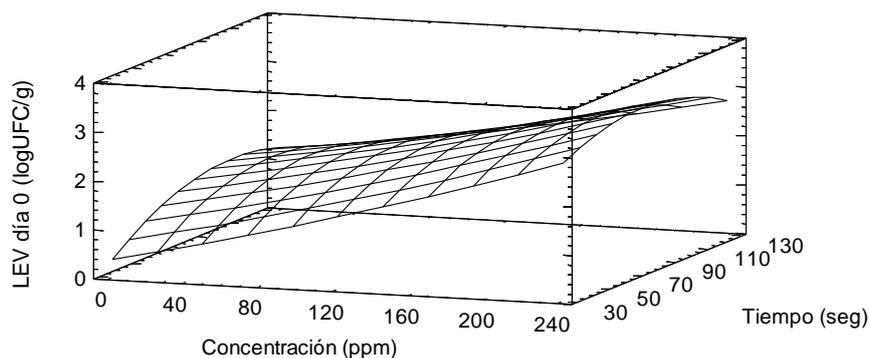


Fig. 3. Gráfico de superficie respuesta para la reducción de levaduras (LEV) en el día 0.

Después de 7 días de almacenamiento, el ANOVA del modelo MH_7 mostró que ningún término del mismo resultó significativo. Por ello, la mejor estimación de la reducción de mohos que puede alcanzarse a los 7 días luego de la desinfección por aspersión con APA, en el rango experimental ensayado, es el promedio de las reducciones de todas las corridas experimentales, la que resultó igual a $2,04 \log \text{UFCg}^{-1}$. Para la reducción de levaduras, el modelo LEV_7 resultó función de la concentración de APA ($p \leq 0,05$), siendo independiente del tiempo (**Fig. 4**). A mayor concentración puede lograrse mayor reducción de levaduras. El máximo valor predicho con el modelo reducido fue de $2,64 \log \text{UFCg}^{-1}$ a 240 ppm y 75 seg, obteniéndose la siguiente ecuación (7):

$$LEV_7 = 1.06 + 6.57 \times 10^{-3} C_{(7)}$$

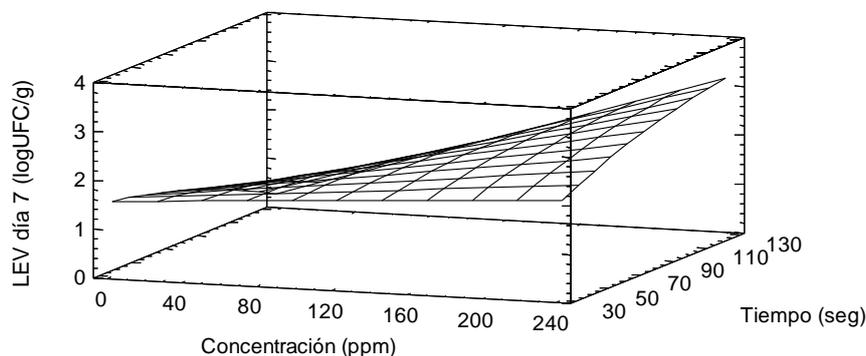


Fig. 4. Gráfico de superficie respuesta para la reducción de levaduras (LEV) en el día 7.

En la **Tabla 2** se muestran las concentraciones de los compuestos bioactivos de las frutillas sin lavar (control), observando que el almacenamiento afecta significativamente los fenoles totales y las antocianinas totales, no así la capacidad antioxidante. Los ANOVAs de los modelos predictivos de las retenciones de los compuestos bioactivos (fenoles totales y antocianinas totales) y de la capacidad antioxidante de las frutillas tratadas con respecto al control mostraron que los factores del tratamiento (concentración de APA y tiempo de aspersión), no influyeron significativamente sobre las respuestas, por lo cual, estas respuestas, no pudieron modelarse con ecuaciones polinomiales de 2º orden. Es por ello que la mejor estimación de las mismas en el rango ensayado de las variables, es el valor promedio de todas las corridas experimentales. La retención promedio con respecto al control de FT, AT y CA en el día de procesamiento y luego de 7 días de almacenamiento a 2°C se muestra en la **Tabla 3**.



Tabla 2. Compuestos bioactivos de frutillas frescas cortadas sin lavar, tanto en el día 0 como después de 7 días de almacenamiento.

Atributo	Día 0	Día 7
Fenoles totales (mgAG100g ⁻¹ FF)	299,74±6,70a	267,37±0,83b
Antocianinas totales (mg P3G100g ⁻¹ FF)	52,59±1,72a	47,09±2,01b
Capacidad antioxidante (mg AA100g ⁻¹ FF)	467,83±35,20a	443,13±14,20a

Atributo con diferente letra son significativamente diferentes (p≤0,05).

Tabla 3. Retención (%) de fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante de frutillas mínimamente procesadas lavadas por aspersión.

Atributo	Tiempo (días)	
	0	7
Fenoles totales (%)	95,34	97,08
Antocianinas totales (%)	78,82	79,37
Capacidad antioxidante (%)	98,15	97,30

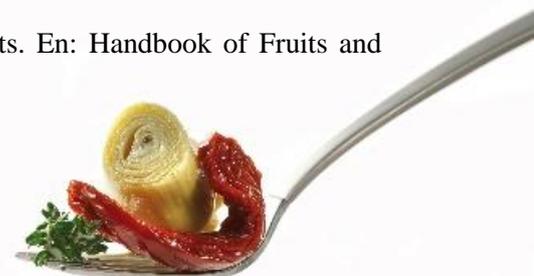
Van de Velde, et al. 2014 estudiaron el lavado-desinfección por inmersión de frutillas mínimamente procesadas cortadas en cuartos, y pudieron modelar las retenciones de compuestos bioactivos (FT, AT y CA) con ecuaciones polinomiales de 2° orden. Por ejemplo, en este caso, optimizando la operación (20 ppm y 52 seg) para obtener la mayor retención de compuestos bioactivos y una reducción de 2 log UFC g⁻¹ en microorganismos aerobios mesófilos, las retenciones obtenidas fueron de 87,4% para FT y 81,1% para AT. En el lavado por aspersión, se obtienen mayores o iguales retenciones en estos compuestos. Por otro lado, la alta retención en la capacidad antioxidante de alrededor del 98% es un parámetro que permite inferir que, además de no perderse los fenoles totales y las antocianinas totales, hay una menor pérdida de vitamina C cuando las frutillas mínimamente procesadas son lavadas con el sistema de aspersión.

CONCLUSIONES

El procedimiento de lavado-desinfección por aspersión permite retener los compuestos bioactivos en forma sustancial y constante y utilizando los modelos desarrollados se puede optimizar el proceso en el rango experimental ensayado, basado solamente en la calidad microbiológica. Los modelos microbiológicos obtenidos permiten conocer el impacto de esta tecnología sobre el proceso indicando sus limitaciones y posibilidades.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, E.M.C., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M. (2012). Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. *Journal Food Engineering*, 108: 417-426.
- Allende, A., Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I. (2006). Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science y Technology*, 17:513-519.
- Biazotto-Bachelli, M. L. B., Amaral, R. D. Á., Benedetti, B. C. (2013). Alternative sanitization methods for minimally processed lettuce in comparison to sodium hypochlorite. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44: 673-678.
- da Silva Pinto, M., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.
- Hilgren, J., Swanson, K. M. J., Diez-Gonzalez, F., Cords, B. (2007). Inactivation of *Bacillus anthracis* spores by liquid biocides in the presence of food residue. *Applied and environmental microbiology*, 73: 6370-6377.
- Heo, H. J., y Lee, C. Y. (2005). Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 1984-1989.
- Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*, 30: 47-55.
- Martín-Belloso O., Soliva-Fortuny R., Oms-Oliu G. (2006): Fresh-cut fruits. En: *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Blackwell Publishing, Iowa: 129–144.



- Ölmez, H., y Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 686-693.
- Özkan, M.; Yemenicioglu, A., Cemeroglu, B. (2005). Degradation of various fruit juice anthocyanins by hydrogen peroxide. *Food Research International*, 38, 1015- 1021.
- Rodgers, S. L., Cash, J. N., Siddiq, M., Ryser, E. T. (2004). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of Food Protection*®, 67: 721-731.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Terefe, N. S., Matthies, K., Simons, L., Versteeg, C. (2009). Combined high pressure-mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (*Fragaria* × *ananassa*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10: 297-307.
- Van de Velde, F (2012). Cambios en el potencial saludable y la calidad nutricional y sensorial de frutillas mínimamente procesadas como consecuencia de las condiciones de procesamiento, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.
- Van de Velde, F., Güemes, D. R., Pirovani, M. E. (2014). Optimisation of the peracetic acid washing disinfection of fresh-cut strawberries based on microbial load reduction and bioactive compounds retention. *International Journal of Food Science & Technology*, 49: 634-640.
- Vandekinderen, I., Van Camp, J., Devlieghere, F., Veramme, K., Denon, Q., Ragaert, P., De Meulenaer, B. (2008). Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56: 5723-5731.



Monitoreo de la calidad microbiológica de canales bovinas proveniente de una faenadora de Villa María (Córdoba- Argentina)

Moyano S (1), Tabasso M (1), Reynoso J (1), Marín G (1).

(1) Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Villa María. Av. Universidad 450. Villa María, Córdoba, Argentina.

silmoyano@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio es determinar la contaminación inicial de la carne faenada en el frigorífico de la Ciudad de Villa María, (Córdoba, Argentina) a lo largo de seis meses. Para ello se tomaron 25 muestras de hisopados de superficies de canales bovinas, de acuerdo al método de la Comunidad Económica Europea (CEE). En cada muestreo (5 en total) se analizaron 5 canales de la misma faena en distintos lugares (brazuelo (2), falda (2), nalga (1)). Se determinaron: recuento de microorganismos aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, *Escherichia coli* (presencia-ausencia en cm^2), recuento de *Staphylococcus* coagulasa (+) y *Clostridium* sulfito reductores. Se utilizaron las técnicas propuestas por la International Commission of Microbiological Specifications for Food (ICMSF). Los resultados promedio son: recuento de aerobios de $2,65 \log_{10}$ a $4,14 \log_{10}$ ufc/ cm^2 ; para enterobacterias de $0,95 \log_{10}$ ufc/ cm^2 y coliformes de $0,97 \log_{10}$ ufc/ cm^2 . Estos resultados son menores al límite para canales bovinas establecido por la CEE. Dos muestras fueron positivas para *E.coli* en el muestreo de la zona de la nalga. *Staphylococcus* coagulasa positiva y *Clostridium* sulfito reductores, fueron negativos en todos los ensayos. Se concluye que la carne bovina faenada cumple con los requisitos de higiene establecidos por la CEE.

Palabras Clave: hisopados de canales, contaminación, monitoreo microbiológico., carne fresca.

ABSTRACT

The objective of this study is to determine the initial contamination of meat slaughtered in the Frigorífico of the Villa María City, (Córdoba, Argentina) over six months. To this end, 25 swab samples were taken from bovine carcass surfaces, according to the European Economic Community (EEC) method. In each sample (5 in total) 5 carcasses of the same work were analyzed in different places (brazuelo (2), Skirt (2), buttock (1)). The counts of mesophilic aerobic microorganisms, enterobacteria, coliforms, *Escherichia coli* (presence-absence in cm^2), *Staphylococcus coagulase* (+) and *Clostridium* sulfite reductant counts were determined. The techniques proposed by the International Commission of Microbiological Specifications for Food (ICMSF) were used. The average results are: aerobic count of $2.65 \log_{10}$ to $4.14 \log_{10}$ cfu / cm^2 ; for enterobacteria of $0.95 \log_{10}$ cfu / cm^2 and coliforms of $0.97 \log_{10}$ cfu / cm^2 . These results are lower than the limit for bovine carcasses established by the EEC. Two samples were positive for *E. coli* in the sampling of the buttock area. *Staphylococcus* coagulase positive and *Clostridium* sulfite reductants were negative in all trials. It is concluded that the slaughtered beef complies with the hygiene requirements established by the EEC.

Keywords: channel swabs, contamination, microbiological monitoring, fresh meat.

INTRODUCCIÓN

En las operaciones de faena de ganado bovino realizadas en matadero- frigorífico es común la contaminación con microorganismos de origen fecal (Arenas de M, L, et al 2004). Estudios recientes sobre la condición microbiológica de los canales bovinos y de la carne de vacuna indican que el número de *Escherichia coli* en gran parte de los productos cárnicos puede aumentar durante los procesos de desposte y trozado de las carne (ICMSF 1985) De esta manera, los esfuerzos actuales para mejorar la seguridad microbiológica de carne están enfocados en la reducción de la contaminación durante el faenado de las canales, basado en el supuesto de la poca contaminación que se produce en etapas posteriores de procesamiento de la carne en un matadero aparentemente bien limpio, donde existe programa de limpieza y desinfección diarias (Gill et al 1999a; Gill et al 1999b; Gill et al 1998).



La evaluación del riesgo microbiológico en un proceso de recolección carne debe implicar la determinación de organismos indicativos de contaminación fecal, tal como *E. coli*, en puntos específicos en el proceso. La investigación ha demostrado que la contaminación de las canales, durante las operaciones de matanza, desposte, se traduce en la presencia de bacterias de potencial importancia para la salud pública (Biss et Hathaway 1995, Charlebois et al 1991, Doyle 1991, Ingram et Roberts 1976, Nortje et al 1989, Roberts 1980). Por lo tanto, el objetivo del control microbiológico es reducir la contaminación al nivel más bajo posible (Brown et al 2000).

No hay ningún estudio científico que describa la contaminación bacteriana o la prevalencia determinada de patógenos en canales de bovino durante las operaciones de faenamiento en el matadero de la ciudad de Villa María Córdoba (Argentina). En este estudio se evaluaron las características higiénicas del proceso de faena de bovino en el matadero Frigorífico de Villa María, mediante la determinación de microorganismos aeróbicos mesófilos (APC), enterobacterias, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa* positivo y *Clostridium* sulfitorreductores.

La decisión de realizar la determinación de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) fue porque es productor de la intoxicación estafilocócica. Es un buen indicador del grado de contacto humano o con alimentos naturales no tratados de origen animal dentro de una fábrica de alimentos. Con frecuencia se presenta en carnes de mamíferos y aves cocinadas, el queso, productos de pastelería rellenos de crema, leche y ensaladas a base de papas o huevo. El control de los brotes de enterotoxinas estafilocócicas depende en gran medida del mantenimiento de los alimentos a una temperatura adecuada. Los estafilococos pueden multiplicarse exponencialmente entre 6 y 45°C. (AA Brizzio, et al 2011). Durante la manipulación en los cortes de carne al menudeo no hay un riesgo especial de estafilococos; debido que las temperaturas normales de manipulación son demasiado bajas para el crecimiento (inferior a los 10°C) y para la producción de toxina (por debajo de los 20°C la producen lentamente). Además su desarrollo y producción de toxina puede inhibirse al crecer juntamente con bacterias el grupo *Pseudomonas-Acinetobacter-Moraxella* (ICMSF 1985 Collins-Thompson et al 1973)

En relación al análisis de *Clostridium* sulfito reductores se realizó porque es un grupo asociado a los *Clostridium* spp y como tal se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos, formadores de esporas, que están normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. Su representante más característico es *Clostridium perfringens*. (OMS 1995) se presenta a veces en el interior de la masa cárnica de la canal en forma vegetativa y en pequeño número, generalmente menos de 1 bacteria cada 10 gramos. Tales células bacterianas se destruyen durante la cocción y no crean problemas especiales. Las esporas de *C. perfringens* que son las responsables indirectas de las toxiinfecciones alimentarias tienen un origen variado no hay pruebas que demuestren que las formas vegetativas esporulen en la carne. Por lo tanto, no parece necesario establecer en la carne criterios numéricos para *C. perfringens*; estas bacterias sólo son peligrosas cuando se descuidan las temperaturas de almacenamiento de los alimentos y la mejor forma de controlarla es prestando atención a la temperatura (ICMSF 1985).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 25 muestras de hisopados en superficies de canales bovinas recién faenadas de acuerdo a las especificaciones de la Decisión de la Comunidad Económica Europea (julio del 2001.- Directiva 64/433/CEE). En cada muestreo (5 en total) se analizaron 5 canales de la misma faena en distintos lugares (brazuelo (2), falda (2), nalga (1) en el período de diciembre de 2015 a junio de 2016.

Cada hisopado se homogeneizó en una solución de 0,1% (peso / vol)) a pH 7,0 de 100 ml. de agua de peptona. Una porción de 1 ml se utilizó para preparar diluciones de 10 decimales hasta 10⁻³ en 0,1% de agua de peptona. Se determinó: recuento microorganismos aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, *Escherichia coli* (presencia-ausencia en cm²), recuento de *Staphylococcus coagulasa* (+) y *Clostridium* sulfito reductores. Las técnicas analíticas aplicadas son las especificadas por International Commission of Microbiological Specifications for Food (ICMSF). (ICMSF 2000).

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (Agar de recuento en placa (PCA).

Enterobacterias (Agar violeta-rojo neutro-bilis glucosa (VRBG)

Coliformes (Agar violeta-rojo neutro-bilis-lactosa (VRBL))

Escherichia coli, sembrando 1 ml de cada hisopado Caldo BRILA. Identificación por pruebas bioquímicas: Fermentación de glucosa, fermentación de lactosa, producción de gas, producción de



sulfhídrico, producción de indol, movilidad, descarboxilación de urea, crecimiento en citrato. Todas estas pruebas corresponden al Enterotest hospitalario básico (Brizuela).

Staphylococcus aureus coagulasa (+) (Agar Baird Parker) .

Clostridium sulfito reductores. Siembra en tubos de 10 ml de Agar TSC (Tryptona Sulfioe Cicloserina).

Los datos obtenidos fueron transformados logarítmicamente (\log_{10} ufc/cm²) y analizados estadísticamente utilizando software específico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido que no hay estudios realizados que implique el monitoreo microbiológico del proceso de faena de canales bovinas en el matadero-frigorífico de la ciudad de Villa María, se decidió comenzar con un plan de extracción de muestras de hisopados de canales bovinas. Cabe señalar que durante la faena y desposte de los bovinos se aplican los principios básicos de las Buenas Prácticas de Manufactura. En la **tabla 1** se detalla la cantidad de animales y los kilos faenados durante el período de muestreo. Con promedio aproximado de 150 animales por día este matadero-frigorífico puede clasificarse como mediano por su producción. El método de sacrificio utilizado para la faena de los bovinos es el tradicional, por noqueo con martillo neumático.

Tabla 1. Cantidad de animales faenados y kilos de carne producidos en el Frigorífico de Villa María (Córdoba) durante el periodo de muestreo realizado.

MES	ANIMALES FAENADOS	KILOS
Noviembre 2015	185	37760
Enero 2016	139	28203
Febrero 2016	159	32192
Marzo 2016	156	31050
Abril 2016	137	27633
Mayo 2016	144	29160
Junio 2016	154	31108

En la **tabla 2** se muestran los resultados obtenidos en los análisis de microorganismos aerobios mesófilos, Enterobacterias, coliformes y *E.coli* de los hisopados de las carcasa bovina del Frigorífico-matadero Villa María.

Con respecto a las determinaciones de *Staphylococcus* coagulasa positiva y *Clostridium* sulfito reductores fueron negativos para todas las muestras analizadas. En el caso de la determinación estafilococo coagulasa positivo, su ausencia en los análisis de los hisopados puede deberse a que la carne y los productos lácteos no pasteurizados, contienen normalmente números reducidos de estafilococos. En los *Clostridium* sulfito reductores su ausencia en las muestras analizadas puede deberse a que están generalmente en bajo número en la masa cárnica en forma de células vegetativas (ICMSF 1985).

No pudo realizarse la comparación de los resultados obtenidos con la normativa del Código Alimentario Argentino debido que en su Capítulo VI (alimentos cárneos y afines) no establece parámetros de las determinaciones microbiológicas efectuadas en hisopados de canales bovina (Código Alimentos Argentino. 2016)

Los datos obtenidos durante los cinco muestreos ninguno superó el límite de condicionalmente aceptable para la Comunidad Económica Europea (Moragas Encuentra, M y De Pablo Busto, M^a B 2015); siendo el promedio total del recuento de aerobios de 2,65 (SD \pm 1) \log_{10} ufc/cm².; este resultado está indicando que la higiene y desinfección fue adecuada. (Tabla 2). Se indica que este valor promedio se calculó sin los resultados del muestreo 5, donde se superó las 4,30 \log_{10} ufc/cm² En la determinación de enterobacterias y coliformes fue de 0,95 (SD \pm 1.01) \log_{10} ufc/cm², y 0,97 (SD \pm 0,97) \log_{10} ufc/cm², respectivamente.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Gill, C.O. (Gill, C.O.et al. 1999(a) y Arenas y colaboradores en un pequeño matadero en Venezuela (Arenas de M, L. et al. 2004) en investigaciones sobre contaminación de canales bovinas faenadas.



Tabla 2 Resultados de los análisis microbiológicos de los hisopados realizados en distintas partes de canales producidas en el Frigorífico de Villa María entre nov 15 a julio 16

MUESTRA	MUESTREO	RECuento AEROBIOS log ufc/cm ²	ENTEROBACTERIAS log ufc/cm ²	COLIFORMES log ufc/cm ²	<i>E.coli</i> Ausencia/ 100cm ²
1	1 Falda	1,65	0	0	0
2	1 Falda	1,92	0	0	0
3	1 Falda	1,69	0	0	0
4	1 Falda	1,78	0	0	0
5	1 Falda	1,95	0	0	0
PROMEDIO		1,825	0	0	0
1	2 Brazuelo	3,30	1,73	1,5	0
2	2 Brazuelo	3,11	2,08	1,5	0
3	2 Brazuelo	3,04	2,30	2,11	0
4	2 Brazuelo	3,35	1,48	1,32	0
5	2 Brazuelo	2,94	1,69	1,60	0
PROMEDIO		3,12	1,856	1,622	0
	3 Nalga	2,90	2,04	2,08	0
	3 Nalga	3,53	2,20	1,95	+
	3 Nalga	3	2,14	2,09	0
	3 Nalga	3,50	2,51	1,9	+
	3 Nalga	3,38	1,87	1,69	0
PROMEDIO		3,302	2,152	1,948	Presencia (2+)
	4 Falda	1,39	0	0	0
	4 Falda	0,84	0	0	0
	4 Falda	4	0	0	0
	4 Falda	3,38	0,30	0	0
	4 Falda	0,30	0	0	0
PROMEDIO		2,034	0,06	0	0
	5 Brazuelo	4,14	0	0	0
	5 Brazuelo	>4,30	0	0	0
	5 Brazuelo	>4,30	0	0	0
	5 Brazuelo	>4,30	0	1,48	0
	5 Brazuelo	>4,30	0	0	0
PROMEDIO		4,274	0	0,296	0

Como se detalla en la **tabla 2**, en la investigación de la presencia de *E. coli*, sólo dos muestras de la zona de la nalga fueron positivas. Estos aislamientos realizados en Agar eosina azul de metileno (EMB) de los tubos positivos de caldo BRILA (lactosa. bilis brillante) se identificaron con el ENTEROTEST hospitalario para la clasificación de Enterobacterias. Esta presencia de *E. coli* puede ser atribuida a la cercanía de la nalga a la zona anal, y haberse generado contaminación de origen intestinal. Cabe destacar que dos hisopados de brazuelo del segundo muestreo dieron positivas por crecimiento en caldo BRILA a 45°C y se identificaron posteriormente como Enterobacter sp.

Si exceptuamos el quinto muestreo (**Tabla 2**), donde las determinaciones microbiológicas realizadas en los hisopados indican el lavado y desinfección de las carcasas no fue adecuado, se observa que hay influencia de los resultados obtenidos con respecto a la zona de la carcasa muestreada. Esto último se verifica con la aplicación del test de ANOVA (análisis de varianza) (**Tabla 3**) donde se establece que hay diferencias significativas. Para la realización del test de ANOVA se dividieron los datos en cuatro grupos (exceptuando el muestreo 5). En la investigación realizada por Arenas y et al., en Venezuela también se encontró diferencias significativas en los resultados obtenidos con respecto a la región de la canal muestreada (Arenas de M, L. et al. 2004). En nuestro estudio la zona más contaminada fue la nalga cuyo promedio en el recuento de aerobios mesófilos fue de 3,30 log₁₀ ufc/cm² y donde de las cinco muestras analizadas, dos dieron positiva para *E.coli*. (**Tabla 2**)



Tabla 3: Resultados del TEST DE ANOVA de las determinaciones de microorganismos mesófilos aerobios, enterobacterias y coliformes de hisopados de canales bovinas faenadas en el matadero de Villa María.

Recuento de microorganismos mesófilos aerobios.					
	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor P
Variación Inter-grupos	4	15,525	3,881	9,31826	2,0245E-4
Variación Intra-grupos	20	8,3308	0,4165		
A nivel 0, 5, las variaciones entre grupos son significativamente diferentes					
Recuento de enterobacterias.					
Variación Inter-grupos	4	0,02717	0,00679	3,36584	0,02921
Variación Intra-grupos	20	0,040436	0,00202		
A nivel 0, 5, las variaciones de población son significativamente diferentes					
Recuento de coliformes.					
Variación Inter-grupos	4	17,62006	4,405016	40,45976	2,56489E-9
Variación Intra-grupos	20	2,177480	0,1088740		
A nivel 0, 5, las variaciones de población son significativamente diferentes					
Gl. Grados de libertad					
Valor F: estadístico calculado a partir del cociente de las medias inter-grupos e intra-grupos					
Valor P: valor crítico. Si F es mayor a P, los grupos de datos analizados presentan diferencias significativas.					

CONCLUSIONES

En este estudio se observó que hay influencia de la parte canal muestreada, siendo la zona de la nalga la más contaminada y dando en dos de las cinco muestras presencia de *E.coli*. Esto determina una contaminación de origen fecal.

En relación a las determinaciones de *Staphylococcus* coagulasa positiva y *Clostridium* sulfitorreductores los resultados obtenidos fueron negativo, lo cual está relacionado con el bajo número de estos microorganismos en la carnes fresca, presentes normalmente en su interior.

Se concluye que la carne bovina faenada cumple con los requisitos de higiene establecidos por la Comunidad Económica Europea, debido que los valores obtenidos en las determinaciones microbiológicas realizadas están por debajo al límite condicionalmente aceptable establecido por las normas europeas (Moragas Encuentra, M y De Pablo Busto, M^a B 2015)

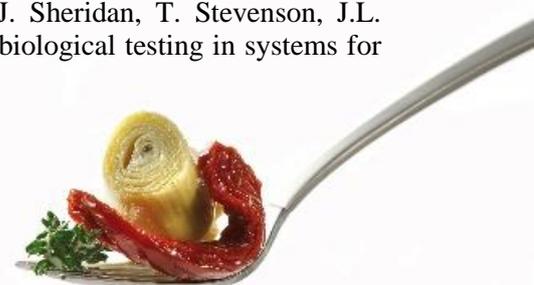
BIBLIOGRAFÍA

Arenas de M, L., Huerta-Leidenz, N., Ortiz, Y., Valera-Matos, M., & Smith, C. 2004. Microbiological Contamination on Beef Carcasses in a Small Abattoir in Venezuela. Departmental Research Reports Colorado State University.

Brizzio AA, FA Tedeschi, FE Zalazar Descripción de un brote de intoxicación alimentaria estafilocócica ocurrido en Las Rosas, Provincia de Santa Fe, Argentina Rev Argent Microbiol, 2011. Pag. 28-32.

Biss, M.E., and S.C. Hathaway. 1995. Microbiological and visible contamination of lamb carcasses according to preslaughter presentation status: Implications for HACCP. J. Food Prot. 58:776-783.

Brown, M. H., C.O. Gill, J. Hollingsworth, R. Nickelson, S. Seward, J.J. Sheridan, T. Stevenson, J.L. Sumner, D.M. Theno, W.R. Osborne, and D. Zink. 2000. The role of microbiological testing in systems for assuring the safety of beef: A review. Int. J. Food Microbiol. 62:7-16.



- Charlebois, R., R. Trudel, and S. Messier. 1991. Surface contamination of beef carcasses by fecal coliforms. *J. Food Prot.* 54:950-956.
- Código Alimentario Argentino 2016 ANMAT www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.as
- Collins-Thompson, D. L., Aris, B, and Hurst, A. 1973. *Growth enterotoxin B synthesis by Staphylococcus aureus S 6 in associative growth with Pseudomonas aeruginosa.* *Can J. Microbiol.* **19**, 1197/1201. ICMSF, 1995.
- Comunidad Económica Europea (CEE) Decisión De La Comisión de 8 de junio de 2001. En línea.
- Gill, C.O., M. Badoni J.C., and McGinnis. 1999 (a). Assessment of the adequacy of cleaning of equipment used for breaking beef carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 46:1-8.
- Gill, C.O., L.P. Baker, and T.J. Jones. 1999 (b) . Identification of inadequately cleaned equipment used in a sheep t 1: Carcasses and contact surfaces. *Meat Sci.* 25:81-97.
- Ingram, M., and T.A. Roberts. 1976. The microbiology of the red meat carcass and slaughterhouse. *Royal Soc. Health J.* 96:270-276.
- ICMSF (International commission on microbiological specifications for foods). 1985. *Ecología microbiana de los alimentos*, Volúmenes 1 y 2. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. Segunda Edición
- ICMSF (International commission on microbiological specifications for foods).2000. *Microorganismos de los Alimentos*, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. Segunda Edición.
- Moragas Encuentra, M; De Pablo Busto, M^a B. Enero, 2015 *Normas microbiológicas de los alimentos*, Bilbao. España. En línea.
- Nortjé, G.L., L. Nel, E. Jordaan, R.T. Naudé, W.H. Holzapfel, and R.J. Grimbeek. 1989. A microbiological survey of fresh meat in the supermarket trade. Par Doyle, M.P. 1991. *Escherichia coli O157:H7 and its significance in food.* *Int. J. Food Microbiol.* 12:298-302.
- Roberts, T.A. 1980. The effects of slaughter practices on the bacteriology of the red meat carcass. *Royal Soc. Health J.* 80:3-9.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo desarrollado con el apoyo de la Secretaria de Ciencia y Tecnología de Universidad Tecnológica Nacional.

Se agradece la colaboración del personal del Frigorífico Villa María para la extracción de las muestras.



Análisis de la capacidad antioxidante de películas compuestas de quitosano

Raspo M.A.^(1,2), Gomez C.⁽³⁾, Andreatta A.E.^(1,2)

⁽¹⁾ IDTQ Grupo Vinculado a PLAPIQUI – FCEFYN – UNC, Av. Vélez Sarsfield 1601, Córdoba (5000), Argentina.

⁽²⁾ UTN Facultad Regional San Francisco, Av. de la Universidad 501, San Francisco, Córdoba (2400), Argentina.

⁽³⁾ Dpto. de Química Orgánica – FCQ – UNC, Haya de la Torre y Medina Allende, Córdoba (5000), Argentina.

RESUMEN

El interés en el desarrollo de películas para la conservación de alimentos se encuentra en aumento debido a la gran disponibilidad de recursos y métodos de síntesis para generarlas. Entre los polisacáridos naturales, quitosano es un biopolímero con amplio uso producido por la desacetilación de quitina, el cual presenta una buena capacidad para formar películas adecuadas como envoltorios de alimentos. Por su parte, los antioxidantes naturales tales como ácido gálico, presentes en muchos alimentos vegetales, actúan como inhibidores de la actividad oxidante de radicales libres, los cuales aceleran la descomposición de alimentos. Por ese motivo, en este estudio se planteó la preparación de películas de quitosano al 1% p/p modificadas por adición de ácido gálico y sorbitol utilizado este último como plastificante para el posterior análisis de la capacidad antioxidante de las mismas cuantificadas por contenido de polifenoles totales (TPC), ensayo DPPH y ensayo CUPRAC. Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de contenido de sorbitol y ácido gálico en la formulación de las películas con la mayor capacidad antioxidante, se aplicó un diseño experimental Doehlert de dos factores para el cual las condiciones óptimas encontradas fueron 0,88%p/p de ácido gálico y 0% de sorbitol.

Palabras clave: quitosano, ácido gálico, antioxidantes, películas, envases activos

ABSTRACT

The interest in the development of food preservation films is increasing due to the wide availability of resources and methods of synthesis to generate them. Among natural polysaccharides, chitosan is a widely available biopolymer obtained from the deacetylation of chitin, which has a good ability to form suitable films for food packaging. Meanwhile, natural antioxidants such as gallic acid, available in many vegetable foods, acts as an inhibitor for the oxidant activity of free radicals, which accelerate the decomposition of food. For this reason, in this study the preparation of films of chitosan 1% w/w modified by addition of gallic acid and sorbitol was proposed for the subsequent analysis of the antioxidant capacity of the same quantified by Total Phenolic Content (TPC), DPPH assay and CUPRAC assay. In order to determine the optimal content conditions of gallic acid and sorbitol in the formulation of the films with the highest antioxidant capacity, a two-factor Doehlert experimental design was applied for which the optimum conditions found were 0.88% w/w of gallic acid and 0% w/w of sorbitol.

Keywords: chitosan, gallic acid, antioxidants, films, active packaging

INTRODUCCIÓN

En la actualidad es posible encontrar innumerables trabajos enfocados en el desarrollo de nuevas tecnologías de envasado, las cuales han surgido a través de diferentes investigaciones e innovaciones como una respuesta a la demanda de las industrias, especialmente de las alimenticias. Los envases activos tienen por objetivo mejorar la seguridad alimentaria, preservar la calidad del alimento y alargar su vida útil (Morris 2017). Existen dos tipos de envases activos: los que actúan como barrera frente a sustancias indeseables tales como O₂, H₂O, CO₂, etc. y los que poseen componentes activos que le otorgan diversas propiedades entre las que podemos mencionar, por ejemplo, la de tener capacidad antioxidante o la de poseer capacidad antimicrobiana frente a determinados microorganismos (Vermeiren et al. 2000; Day y Potter 2011).



Por otro lado, el creciente interés por el cuidado del medio ambiente hace que las industrias se vean frente al desafío de reemplazar sus tradicionales envases por otros que sean de origen natural como los biopolímeros, biocompuestos, etc. La generación de envases biodegradables con el agregado de principios activos es una de las tecnologías que se encuentran en constante estudio en diferentes campos de investigación e industrias.

Dentro de todo el universo de alternativas posibles, la utilización de biopolímeros como precursores de envases y/o películas es la que lleva ventaja, debido a que éstos son naturales y biodegradables. Quitosano (QS) es un polisacárido lineal, derivado de quitina presente en el caparazón de insectos y crustáceos y está compuesto por cadenas de β -1,4-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina aleatoriamente distribuidas (Xie et al. 2014). Es insoluble en agua y soluble en ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido láctico (Pillai et al. 2009; Rinaudo 2006).

El uso de compuestos fenólicos y extractos en envases activos atrae un particular interés desde que éstos compuestos han demostrado actividad antimicrobiana y antioxidante. Entre ellos, el ácido gálico (GA) o ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico es un metabolito secundario presente en diversas especies vegetales tales como arándanos, manzanas, lino y té, que se lo conoce por su natural actividad antioxidante además de su actividad antimicrobiana (Aruoma et al. 1993; Chanwitheesuk et al. 2007).

El presente trabajo aborda el estudio de la preparación de películas de quitosano modificadas por el agregado de distintas concentraciones de ácido gálico, utilizando sorbitol (SB) como plastificante con el objetivo de evaluar diferentes propiedades, centrándose fundamentalmente en el análisis de la capacidad antioxidante de las mismas utilizando el diseño experimental Doehlert de dos factores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos fueron utilizados sin previa purificación después de su adquisición. Quitosano (92%, Parafarm, Argentina); ácido acético glacial (AA) (99,5%, Cicarelli, Argentina); ácido gálico anhidro (98,0%, Biopack, Argentina); ácido clorhídrico (HCl) pro-análisis (36,5-38%, Anedra, Argentina); hidróxido de sodio (NaOH) pro-análisis (97%, Cicarelli, Argentina), sorbitol (70%, Polyglobe, Argentina); 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Aldrich Chemistry, EEUU); 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid - Trolox (97%, Aldrich Chemistry, EEUU).

La mezcla de reacción se preparó disolviendo 0,10 g de QS en buffer de ácido acético/acetato 0,10 M a pH 4, a la cual se le incorporó GA bajo agitación hasta alcanzar su disolución a 25°C. Las mezclas finales obtenidas presentaron una concentración final de QS al 1% p/p, mientras que las concentraciones de GA fueron variadas en (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1) % p/p y las de SB en (0; 2,5; 5; 7,5; 10) % p/p. Posteriormente, cada mezcla de reacción se vertió en cápsulas de Petri donde se logró la formación de las películas a partir de la evaporación del solvente a 25°C, en un proceso denominado *casting*.

Por su parte, las películas fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-Visible (Shimadzu UV1800) y el espesor de las películas se determinó mediante un espesímetro (Schwyz, Switzerland) de una precisión de 0,001 mm. La opacidad de las películas se determinó como el área bajo la curva de absorbancia (UA) en el rango del espectro visible ($\lambda=400-800$ nm), según el método de González (2013). Para poder comparar resultados, este valor fue normalizado dividiendo por el espesor de cada película.

La cantidad de antioxidante activo se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Siripatrawan et al. (2010) con algunas modificaciones. Este ensayo se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) en productos vegetales y se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Para poder expresar los resultados, se realizó una curva de calibración del ensayo utilizando GA como agente patrón, y los resultados se expresaron en mg de GA por mg de película.

Por otro lado, la capacidad antioxidante se midió a través del ensayo de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilil (DPPH) y del ensayo de reducción del ion cúprico (CUPRAC). El ensayo DPPH se realizó según lo expresado por Blois (1958) con algunas modificaciones. En el mismo se determina el grado de decoloración que provocan los componentes de un extracto a una solución metanoica de dicho reactivo a una longitud de onda de 517 nm, cuantificando de esta manera la capacidad captadora de radicales libres del extracto. El método CUPRAC, descrito por Apak et al. (2004), se basa en la medición de la absorbancia a 450 nm del cromóforo CUPRAC [Cu(I)-Nc quelato] formado como resultado de la reacción redox de antioxidantes con el reactivo CUPRAC [Cu(II)-Nc]. En ambos casos, Trolox (TR) fue utilizado para realizar



la curva de calibración y de esta manera obtener los resultados en unidades TEAC (Trolox Equivalent Assay Capacity) que determinan mg de TR por mg de película.

El diseño experimental para el desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo mediante el uso de la Metodología de Superficie de Respuesta a partir de un modelo de dos factores (Doehlert, 1970) donde los mismos fueron el contenido de GA (0 – 1% p/p) y el contenido de SB (0 – 10% p/p) utilizado en la formulación de las películas. La selección y el rango de estas variables se basó en experiencias previas. Para llevar a cabo el modelo, el contenido de SB fue codificado en cinco niveles (-1; -0,5; 0; 0,5; 1), mientras que el contenido de GA en tres (-1; 0; 1), tal como se muestra en la **Tabla 2**. El diseño se basa en el análisis de las respuestas experimentales de TPC (Y_1), TEAC a partir del ensayo de DPPH (Y_2) y TEAC a partir del ensayo de CUPRAC (Y_3), las cuales fueron halladas en 6 formulaciones de mezclas reactivas diferentes, y en tres formulaciones idénticas del punto central.

Tabla 1. Dominio experimental y valores codificados para las variables independientes utilizadas en el Modelo de Doehlert de dos factores

		Ácido Gálico (X_1)			
Concentración (%p/p)		0,5	0,75	1	
Valores Codificados		-0,866	0	0,866	
		Sorbitol (X_2)			
Concentración (%p/p)	0	2,5	5	7,5	10
Valores Codificados	-1	-0,5	0	0,5	1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las películas obtenidas presentan una buena apariencia, teniendo en cuenta su homogeneidad, transparencia y brillo, como se puede observar en la **Figura 1** para una formulación al 1% p/p de GA y QS y 2,5% p/p de SB.

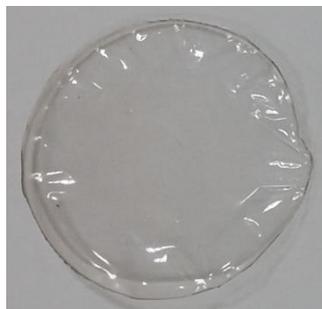


Figura 1. Película de quitosano al 1% p/p con GA al 1% p/p y SB al 2,5% p/p.

La caracterización UV-Visible permitió obtener las curvas espectrales de una película obtenida a partir de una mezcla de reacción al 1% p/p QS, 0,75% p/p GA y 2,5% p/p de SB y de otra película de igual contenido en QS y GA con 7,5% p/p de SB. Este análisis se muestra en la **Figura 2** y se puede observar que no existen diferencias importantes entre las dos películas frente al agregado de SB utilizado como plastificante. Este resultado implica que no hay modificaciones en la estructura química de la misma frente al agregado del mismo.



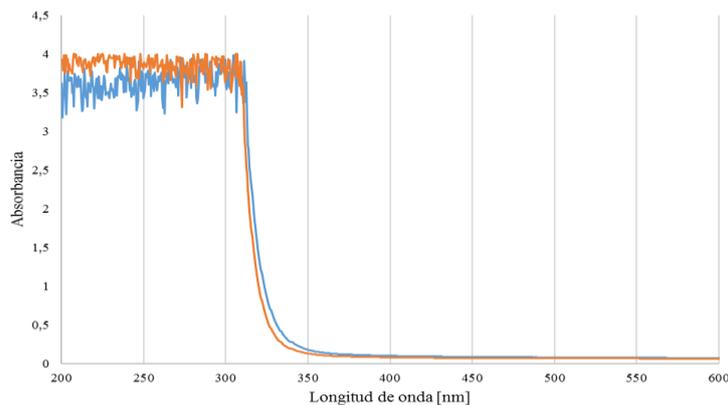


Figura 2. Curvas espectrales de una película obtenida a partir de una mezcla de reacción al 1% p/p QS, 0,75% p/p GA y 2,5% p/p de SB (línea azul) y de 1% p/p QS, 0,75% p/p GA y 7,5% p/p de SB (línea roja).

La caracterización UV-Visible modificando el % p/p de GA y manteniendo constante el % de SB y QS para una película al 1% p/p QS, 0,75% p/p GA 2,5% p/p de SB y frente a otra de 0,5% p/p GA se puede observar en la **Figura 3**. En la misma, se observa una diferencia de absorbancia notable en el rango que va de los 325 a los 375 nm de longitud de onda, lo cual seguramente está dado por una mayor cantidad de GA y una conformación distinta de la película.

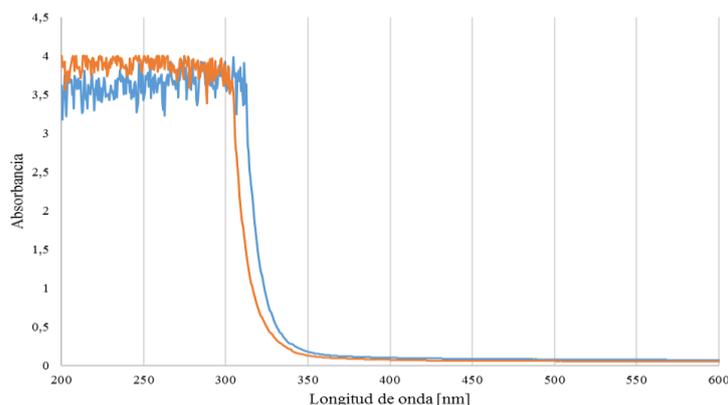


Figura 3. Curvas espectrales de una película obtenida a partir de una mezcla de reacción 1% p/p QS, 0,75% p/p GA y 2,5% p/p de SB (línea azul) y de una mezcla de reacción al 1% p/p QS, 0,5% p/p GA y 2,5% p/p de SB (línea roja).

El espesor promedio de las diferentes películas, se realizó a partir de 15 mediciones aleatorias sobre la superficie de las mismas, teniendo en cuenta que fueron preparadas todas siguiendo el mismo procedimiento y a partir del mismo volumen inicial de mezcla de reacción. El promedio de estas mediciones y las composiciones de las mezclas reactivas de las películas analizadas se muestran en **Tabla 2**.

Tabla 2. Espesores de diferentes películas

GA (% p/p)	SB (% p/p)	Espesor (μm)
0,5	2,5	20,5 \pm 3,2
1	2,5	52,2 \pm 6,8
0,75	5	68,1 \pm 7,2
0,75	10	90,8 \pm 8,0



A partir de los datos mostrados en la **Tabla 2**, se observa que el aumento de concentración de alguno de los dos componentes en la mezcla de reacción aumenta el espesor promedio de las películas. Este comportamiento se debe al hecho de que la masa seca resultante de la película aumenta. Estos resultados permiten inferir la existencia de películas con distintas porosidades, las cuales son de interés a la hora de analizar la permeabilidad de la película para diferentes gases.

La opacidad de las películas y su influencia con el contenido de GA o SB se muestran en la **Tabla 3**. Los valores de opacidad obtenidos para cada película son particularmente bajos, lo cual representa una notable transparencia de los mismos. Sin embargo, hay que destacar que tanto el aumento de GA como el de SB aumenta dicha transparencia.

Tabla 3. Valores de opacidad de diferentes películas

GA (% p/p)	SB (% p/p)	Opacidad (UA/ μ m)
0,5	2,5	0,138
1	2,5	0,055
1	7,5	0,026

Con el objetivo de optimizar la formulación de la mezcla reactiva de las películas compuestas de QS con las mejores propiedades antioxidantes, se realizó el diseño experimental para las condiciones que se mencionaron en la sección de Materiales y métodos. La **Tabla 4**, muestra los resultados de las variables respuesta para cada uno de los ensayos realizados.

Tabla 4. Ensayos y resultados experimentales para los análisis de TPC, DPPH y CUPRAC

Ensayo	Variables		Respuestas		
	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₃
	GA (% p/p)	SB (% p/p)	TPC (mg GA/mg película)	TEAC en DPPH (mg TR/mg película)	TEAC en CUPRAC (mg TR/mg película)
1	0	0	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,7 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
2	0	0	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$
3	0	0	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
4	0	-10	$1,9 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	$4,8 \cdot 10^{-3}$
5	0	10	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$
6	0,866	-0,5	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$
7	-0,866	-0,5	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$
8	0,866	0,5	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,4 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
9	-0,866	0,5	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$

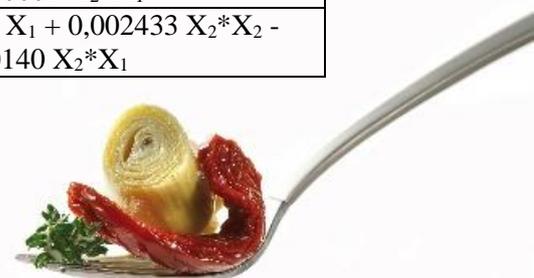
180

Los resultados experimentales fueron utilizados para obtener los modelos de regresión. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando Minitab Statical Software (v 17, USA).

El análisis estadístico, demostró una buena correlación entre las variables independientes y cada una de las respuestas, el cual se observa en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación para cada una de las variables respuesta

Respuesta	R ²	Ecuación de Regresión
Y ₁	0,9557	$0,015667 - 0,003000 X_2 + 0,002667 X_1 - 0,000167 X_2 * X_2 - 0,00200 X_1 * X_1 + 0,00133 X_2 * X_1$
Y ₂	0,9457	$0,000002 - 0,000000 X_2 - 0,000000 X_1 + 0,000000 X_2 * X_2 + 0,000001 X_1 * X_1 - 0,000001 X_2 * X_1$
Y ₃	0,9007	$0,001867 - 0,000817 X_2 + 0,001167 X_1 + 0,002433 X_2 * X_2 - 0,001956 X_1 * X_1 - 0,00140 X_2 * X_1$



Las superficies de respuesta para cada una de las variables en función del contenido de GA y SB se muestran en la **Figura 4**.

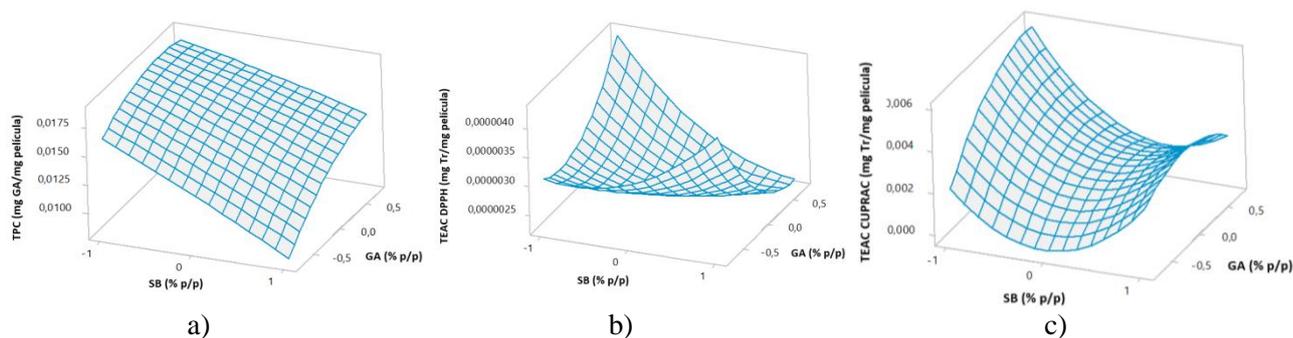


Figura 4. Superficies de respuestas para a) TPC, b) TEAC a partir del ensayo de DPPH, c) TEAC a partir del ensayo de CUPRAC en función del contenido de GA y SB.

Los valores óptimos de preparación de la película, fueron obtenidos del análisis de los gráficos y de sucesivas optimizaciones numéricas utilizando el software mencionado anteriormente. Con una deseabilidad del 98%, se determinó que la película que maximiza los valores de TPC, TEAC a partir de DPPH y TEAC a partir de CUPRAC es aquella conformada por de 0,88% p/p de GA y 0% de SB. Para corroborar la aplicabilidad del modelo, se prepararon tres películas en la formulación óptima, y se le realizaron los ensayos correspondientes. La **Tabla 6** muestra un comparativo entre los valores predichos por el modelo y los valores determinados experimentalmente junto con el desvío estándar de un total de tres mediciones.

Tabla 6. Valores predichos y experimentales para una película con 0,88% p/p de GA y 0% p/p de SB.

Valores	X1 [%p/p]	X2 [%p/p]	Y1 [mg GA/mg película]	Y2 [mg TR/mg película]	Y3 [mg TR/mg película]
Predichos	0	0,88	$1,9 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-6}$	$5,9 \cdot 10^{-3}$
Experimentales	0	0,88	$1,9 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{-6} \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$	$5,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,6 \cdot 10^{-3}$

A partir de los datos reportados en la **Tabla 6**, se puede observar un correcto ajuste entre el modelo y los datos experimentales.

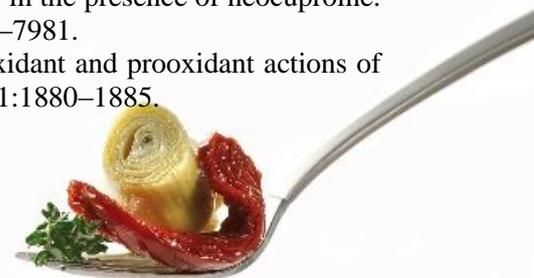
CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que una variación en la concentración de GA en la mezcla de reacción conduce a un efecto directo sobre la actividad antioxidante de la película, encontrando un máximo en la misma cuando este valor es de 0,88% p/p. Con respecto al agregado de SB, si bien el valor óptimo es en 0% p/p, hay que tener en cuenta que en el presente trabajo no se puso en investigación las propiedades mecánicas de las películas, en las cuales el agregado de SB debería actuar de manera determinante. El modelo Doehler de dos factores aplicado ajusta significativamente con el desarrollo experimental. Hasta el momento los parámetros estudiados han resultado prometedores para alcanzar películas con propiedades deseables para una futura aplicación como material para envoltorio de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Apak R., Güçlü K, Ozyürek M, Karademir SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26):7970–7981.

Aruoma OI, Murcia A, Butler J, Halliwell B. 1993. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41:1880–1885.



- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200.
- Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*, 100:1044–1048.
- Day BPF, Potter L. 2011. En: Coles R, Kirwan MJ. *Food and Beverage Packaging Technology*. 2° ed. Hoboken: John Wiley & Sons. Pág. 251-262.
- Doehlert DH. 1970. Uniform Shell Designs. *Journal of the Royal Statistical Society: Applied Statistics*, 19(3):231-239.
- Gonzalez A, Alvarez Igarzabal CI. 2013. Soy protein – Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 33:289-296.
- Morris BA. 2017. Introduction. En: Morris BA. *The Science and Technology of Flexible Packaging*. 1° ed. Oxford: William Andrew Publishing. Pág: 3-21.
- Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7):641–678.
- Rinaudo M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7):603–632.
- Siripatrawan U, Harte BR. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8):770–775.
- Vermeiren L, Devlieghere F, van Beest M, Kruijf N, Devere J. 2000. Development in the active packaging of foods. *The Journal of Food Technology in Africa*, 5(1):6-13.
- Xie M, Hu B, Wang Y, Zeng X. 2014. Grafting of Gallic Acid onto Chitosan Enhances Antioxidant Activities and Alters Rheological Properties of the Copolymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:9128–9136.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONICET, Universidad Tecnológica Nacional (PID 3486 and PID 3458), SeCyT Universidad Nacional de Córdoba, y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por la ayuda económica recibida.



Efecto de cationes monos y divalentes en la gelificación de clara de huevo nativa inducida por álcali

Ríos R. S.^{1,2} Appella E. S.³ Farías M.E.^{2,4} Aguerre R. J.^{1,2}

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

En China, se desarrollaron métodos para conservar huevos basados en la aplicación de mezclas de arcilla, ceniza, sal y cal viva durante varias semanas a meses. Los cambios químicos y físicos de la clara y yema de huevo imparten un sabor nuevo que muchas personas disfrutan, con el beneficio añadido de una prolongada vida útil. La evolución de la gelificación de la clara de huevo nativa de gallina por álcali en presencia de cationes monovalentes (K^+ y Na^+) y divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) fue monitoreada mediante ensayos reológicos. Se utilizó clara de huevo nativa y soluciones de NaOH al 4,2% p/p, con 5% p/p de sales monovalentes (KCl o NaCl) y 0,2% p/p desales divalentes ($CaCl_2$, $MgCl_2$ o $ZnCl_2$). Los cationes influyeron en la gelificación alcalina de la clara nativa, los geles formados en presencia de NaCl fueron menos elásticos. Sin embargo, cada uno de los cationes divalentes intervino de manera diferente en la formación del gel. El $MgCl_2$ o $ZnCl_2$ ejercieron un efecto de disminución de las características elásticas en los geles alcalinos de clara. Todo esto indica que el reemplazo de las sales de curado para elaborar huevos Pidan debe ser evaluado cuidadosamente y debería estudiarse la formación de lisinoalanina con la combinación de KCl y $MgCl_2$.

Palabras Clave: Huevo Pidan, gelificación alcalina de clara de huevo, comportamiento reológico.

ABSTRACT

In China, in order to preserve eggs for several weeks and months, methods based on mixtures of clay, ash, salt and quicklime were developed. In addition to increasing egg's life, chemical and physical changes on the egg white and yolk impart a new flavor that many people enjoy. The dynamic of gelation of native egg white in alkali in the presence of monovalent cations (K^+ y Na^+) and divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) was monitored by rheological tests. Solutions of native egg white and NaOH at 4.2% w/w were used, with 5% w/w of monovalent salts (KCl or NaCl) and 0.2% w/w of divalent salts ($CaCl_2$, $MgCl_2$ o $ZnCl_2$). Cations influenced in the alkali gelation of native egg white, in presence of NaCl gels were less elastic. However, each of the divalent cations had different effect in gel formation. $MgCl_2$ o $ZnCl_2$ salts decreased elastic characteristics of alkaline gels. This shows that the replacement of curing salts to make Pidan eggs should be carefully evaluated and the formation of lysinoalanine with KCl y $MgCl_2$ should be studied.

Keywords: Pidan egg, egg white alkali gelation, rheological behavior.

INTRODUCCIÓN

En China, se desarrollaron métodos para conservar huevos basados en la aplicación de mezclas de arcilla, ceniza, sal y cal viva durante varias semanas a meses. Los cambios químicos y físicos de la clara y yema de huevo imparten un sabor nuevo que muchas personas disfrutan, con el beneficio añadido de una prolongada vida útil. El producto así conservado se denomina Pidan, y es conocido en occidente como Huevo Centenario, Huevo Milenario, Huevo en Conserva, o Huevo de Dragón. La gelificación del huevo se debe a la penetración del álcali a través de la cáscara y las membranas testáceas (WangyFung, 1996). Durante el tratamiento alcalino, se forma la nefrotoxina lisinoalanina (Chang et al., 1999). Una de las estrategias para inhibir su formación es con la incorporación de cationes metálicos (Chang et al., 1999; Chen et al., 2015). Los cationes forman complejos con el grupo imidazol de la histidina y reducen la formación de puentes disulfuro. 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). Sin embargo, no hay trabajos que analicen el aspecto reológico de la clara de huevo en presencia de las sales de curados, sean estas inhibidoras o no de la



lisinoalanina. Estudiar la gelificación alcalina de la clara por reología dinámica es importante para predecir las características de un producto final que lleva meses, ahorrando tiempo, esfuerzo y materiales. En este trabajo, la clara de huevo se trató con soluciones alcalinas fuertes a temperatura ambiente. El objetivo del trabajo fue monitorear la evolución de la gelificación alcalina de la clara de huevo nativa a través de reología dinámica en presencia de cationes monovalentes (K^+ y Na^+) y cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}).

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 minutos a 300 rpm y temperatura ambiente. La elección de los cationes monovalentes y divalentes se basó en el trabajo realizado por Ganasen Benjakul (2010). Se prepararon diferentes soluciones salinas según la **Tabla 1**.

Tabla N° 1: Composición porcentual (p/p) de las soluciones salinas.

soluciones	Zn ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	NaOH
KCl				5		4,2
KCl + ZnCl	0,2			5		4,2
KCl + CaCl		0,2		5		4,2
KCl + MgCl			0,2	5		4,2
NaCl					5	4,2
NaCl + ZnCl	0,2				5	4,2
NaCl + CaCl		0,2			5	4,2
NaCl + MgCl			0,2		5	4,2

Actividad acuosa

Las mediciones de actividad acuosa de las soluciones se realizaron con un equipo Aqualab (Pullman, WA, USA) a temperatura ambiente. Se reportó la media de triplicados.

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 (25°C) por un sistema Peltier. Se utilizó un sistema platos paralelos con una sonda PP25 dejando un gap de 1 mm. Se vertieron 400 μ l de clara en el plato del reómetro e inmediatamente 90 μ l de solución salina. A continuación se procedió con la medición.

Dinámica de gelificación

Se registró la evolución del módulo elástico (G'), módulo de pérdida (G'') y la tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$) durante 15 minutos, tiempo suficiente para permitir que G' alcance el equilibrio a 25 °C. La frecuencia fue de 1 Hz y la deformación 0,01%, condiciones correspondientes a la región de viscoelasticidad lineal.

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 25°C con una deformación del 5%, condición correspondiente a la región de viscoelasticidad lineal.

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.

Tabla 2: Valores medios y desviaciones estándares de la actividad acuosa de las soluciones alcalinas.

NaOH	NaCl	KCl
0,963 \pm 0,003	0,929 \pm 0,001	0,930 \pm 0,001
NaOH + NaCl + CaCl ₂	NaOH + NaCl + MgCl ₂	NaOH + NaCl + ZnCl ₂
0,934 \pm 0,000	0,934 \pm 0,001	0,933 \pm 0,002
NaOH + KCl + CaCl ₂	NaOH + KCl + MgCl ₂	NaOH + KCl + ZnCl ₂
0,938 \pm 0,000	0,941 \pm 0,001	0,936 \pm 0,001



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 2** revela que los valores de la actividad acuosa de las soluciones alcalinas utilizadas fue cercana a 0,937. Esto indica que los cationes monovalentes y divalentes no ejercieron ningún efecto particular en la a_w de las soluciones alcalinas.

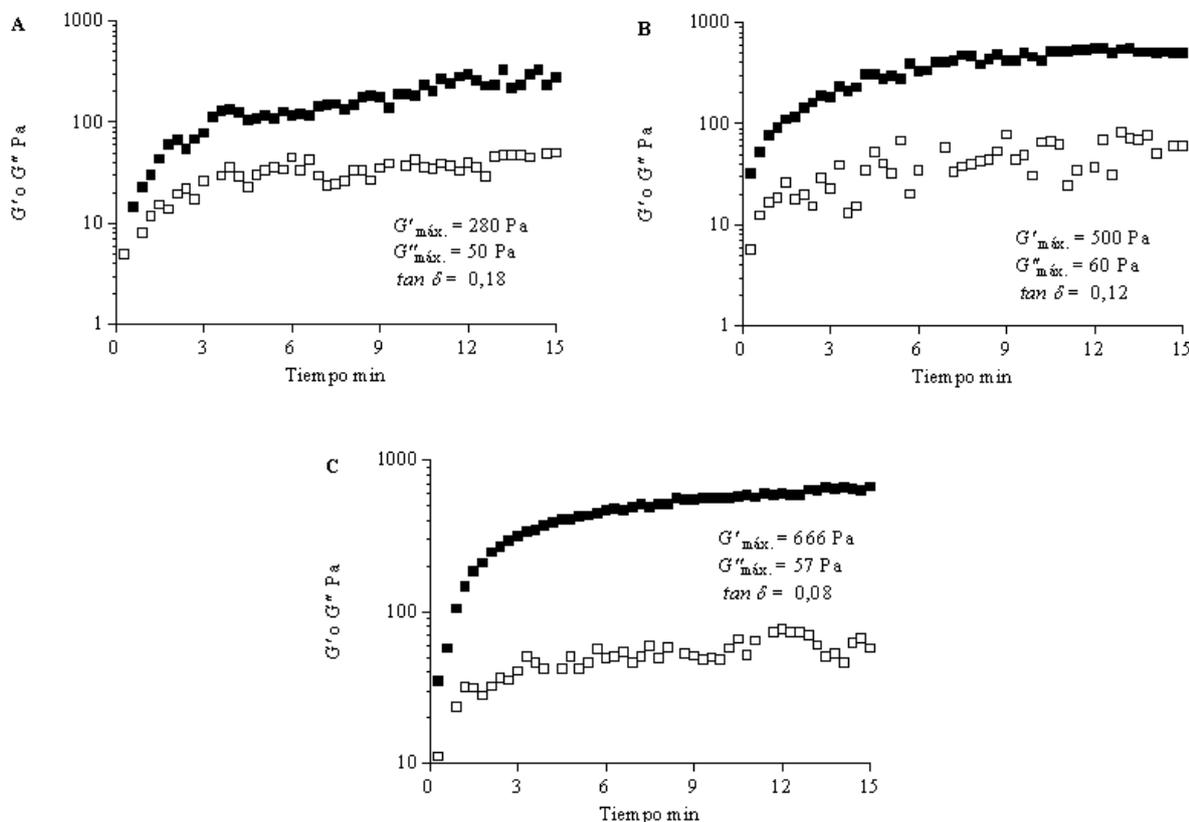


Figura 1: Evolución de G' , G'' y $\tan \delta$ en la gelificación alcalina de clara de huevo en presencia de diferentes sales: (A) NaCl, (B) KCl y (C) sin sales

Puede observarse en la **Figura 1** la evolución de la gelificación alcalina de clara de huevo. La gelificación prácticamente fue inmediata (cruce entre G' y G'') y luego del punto de gel, G' creció rápidamente hasta alcanzar un valor de equilibrio ($G'_{m\acute{a}x.}$). El valor obtenido para $G'_{m\acute{a}x.}$ en la gelificación de clara por álcali y sin sales (**Figura 1 C**) fue 666 Pa. Sin embargo en presencia de los cationes monovalentes fue inferior, obteniéndose un valor de 500 Pa para el sistema clara + NaOH + KCl y 280 Pa para el sistema clara + NaOH + NaCl.

Los sistemas en presencia de sales (NaCl y KCl) presentaron mayores valores de $\tan \delta$ (0,18 y 0,12 respectivamente) que el sistema clara + NaOH (0,08), revelando un ligero incremento de la viscoelasticidad.



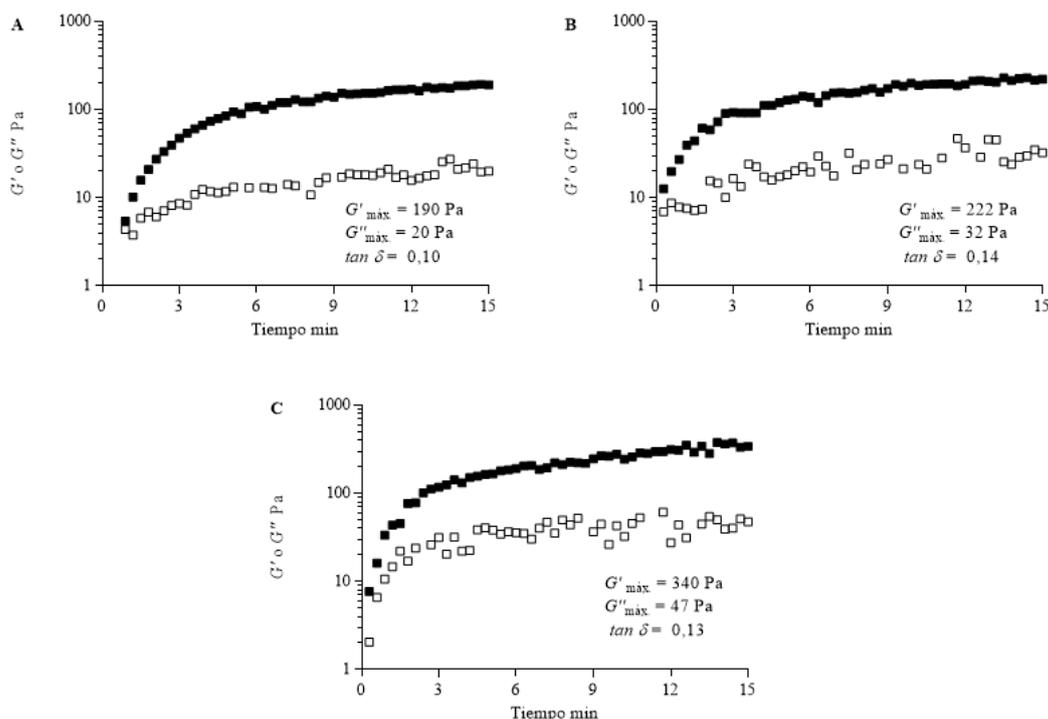


Figura 2: Evolución de G' , G'' y $\tan \delta$ en la gelificación alcalina de clara de huevo en presencia de diferentes sales: (A) $ZnCl_2 + NaCl$, (B) $MgCl_2 + NaCl$ y (C) $CaCl_2 + NaCl$

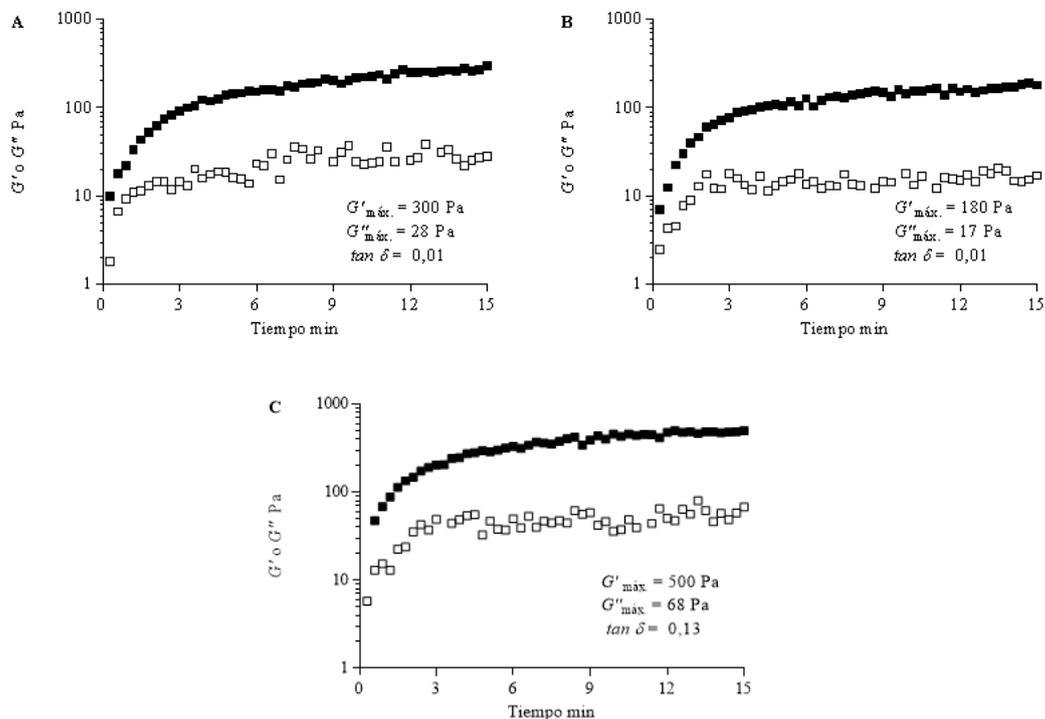


Figura 3: Evolución de G' , G'' y $\tan \delta$ en la gelificación alcalina de clara de huevo en presencia de diferentes sales: (A) $ZnCl_2 + KCl$, (B) $MgCl_2 + KCl$ y (C) $CaCl_2 + KCl$

La presencia de los cationes divalentes (Zn^{2+} o Mg^{2+} o Ca^{2+}) en el sistema (Clara + NaOH + NaCl) se muestran en la **Figura 2**. Para los sistemas con NaOH + NaCl + $ZnCl_2$ y NaOH + NaCl + $MgCl_2$ se obtuvieron valores ligeramente inferiores de $G'_{m\acute{a}x}$ (190-220 Pa) (**Figuras 2 A y B**) que el sistema con NaOH + NaCl (**Figura 1 A**). Por otro lado, el gel que se formó con el sistema NaOH + NaCl + $CaCl_2$ mostró un valor



de $G'_{\text{máx}}$ levemente superior de 340 Pa (**Figura 2 C**). Los valores de $\tan \delta$ fueron más bajos (entre 0,10 y 0,14), mostrando que las sales divalentes otorgaron una mayor naturaleza elástica a los geles de clara con NaCl.

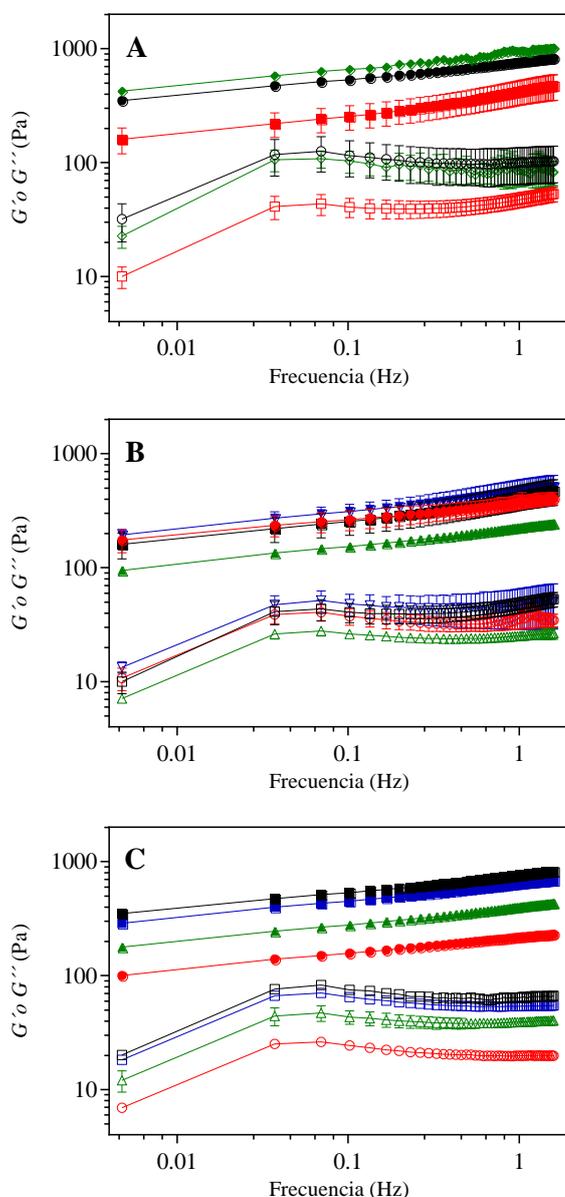


Figura 4: Barridos de frecuencia de los geles de clara de huevo formados por álcali.
 Símbolos cerrados: G' y símbolos abiertos: G'' .
 A) Clara + NaOH (\blacklozenge); Clara + NaOH + KCl (\bullet) y Clara + NaOH + NaCl (\blacksquare).
 B) Clara + NaOH + NaCl (\bullet); Clara + NaOH + NaCl + ZnCl_2 (\blacktriangle);
 Clara + NaOH + NaCl + MgCl_2 (\bullet) y Clara + NaOH + NaCl + CaCl_2 (\blacksquare).
 C) Clara + NaOH + KCl (\blacksquare); Clara + NaOH + KCl + ZnCl_2 (\blacktriangle);
 Clara + NaOH + KCl + MgCl_2 (\bullet) y Clara + NaOH + KCl + CaCl_2 (\blacksquare).

La **Figura 3** muestra la evolución de G' de los sistemas de clara de huevo y soluciones de NaOH + KCl y las sales divalentes (ZnCl_2 , MgCl_2 y CaCl_2). La presencia de las sales ZnCl_2 y MgCl_2 disminuyeron los valores de $G'_{\text{máx}}$ desde 500 Pa a aproximadamente la mitad (300 y 180 Pa, respectivamente) y no cambiaron en presencia de CaCl_2 . Es importante notar, el significativo cambio en $\tan \delta$ (0,01) que mostraron los sistemas con las sales divalentes ZnCl_2 y MgCl_2 . La gelificación en todos los sistemas con sales divalentes también fue inmediata (**Figuras 2 y 3**).



Los barridos de frecuencia se muestran en la **Figura 4** y revelaron la formación de geles fuertes (G' mayor a G'') en el rango de frecuencia estudiado. La **Figura 4 A** muestra los espectros mecánicos de los sistemas de clara de huevo y soluciones de NaOH + KCl o NaCl. Los resultados mostraron geles fuertes, sin embargo la presencia de NaCl disminuyó las características elásticas de los geles.

La presencia de $ZnCl_2$ fue en detrimento de las propiedades finales del gel tanto para los sistemas con NaCl como con KCl. Para los sistemas con NaCl, el $MgCl_2$ fue notablemente en detrimento de las características finales del gel.

En las condiciones de pH altamente alcalinas de este trabajo, las moléculas de proteínas tienen una alta carga negativa por lo que va en detrimento de las interacciones proteína-proteína, por consiguiente es de esperar que las interacciones de tipo no covalentes no sean las interacciones principales en la formación de la red del gel. Por ello, las interacciones de mayor relevancia son las covalentes, o sea la formación de puentes disulfuro (Chen et al., 2015). Una disminución de las características viscoelásticas (menor G' y mayor $\tan \delta$) en presencia de sales puede ser atribuido a una disminución de las interacciones covalentes.

El Zn^{2+} es reconocido como inhibidor de la formación de lisinoalanina (Chang et al., 1999), pero la combinación de KCl y $MgCl_2$ debería estudiarse.

CONCLUSIONES

Los cationes influyeron en la gelificación alcalina de la clara nativa, los geles formados en presencia de NaCl fueron menos elásticos. Sin embargo, cada uno de los cationes divalentes intervino de manera diferente en la formación del gel. $MgCl_2$ o $ZnCl_2$ ejercieron un efecto de disminución de las características elásticas en los geles alcalinos de clara. Todo esto indica que el reemplazo de las sales de curado para elaborar huevos Pidan debe ser evaluado cuidadosamente y debería estudiarse la formación de lisinoalanina con la combinación de KCl y $MgCl_2$.

BIBLIOGRAFÍA

- Chang, Hung-Min, Tsai Cheng-Fang y Li Chin-Fung. 1999. Inhibition of lysinoalanine formation in alkali-pickled duck egg (Pidan). *Food Research International*, 32(8): 559-563.
- 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 caseinomacropéptide. *International Dairy Journal*, 55: 17-25.
- Ganasen P., and Benjakul S. 2010. "Physical properties and microstructure of pidan yolk as affected by different divalent and monovalent cations" *LWT- Food Science and Technology*, 43: 77-85.
- Martínez, María J., Carrera Sánchez Cecilio, Rodríguez Patino Juan M. y Pilosof Ana M. R. 2012. Interactions between b-lactoglobulin and casein glycomacropéptide on foaming. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89(0): 234-241.
- Wang, J., and Fung, D.Y. 1996. Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. *Critical Reviews in Microbiology*, 22(2): 101-138.

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).



Obtención de complejos de polielectrólitos a base de pectina y goma brea

Slavutsky A.M.^{1,2}, Bravo J.M.¹, Bertuzzi M.A.^{1,2}

¹ Facultad de Ingeniería-Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, Salta, Argentina.

² INIQUI-CONICET, Av. Bolivia 5150, Salta, Argentina.

Mail: amslavutsky@gmail.com

RESUMEN

Los polielectrólitos son macromoléculas con gran cantidad de grupos funcionales que presentan carga o la pueden desarrollar según las condiciones del medio. Los complejos de polielectrólitos se forman mediante la mezcla de soluciones de polielectrólitos con carga opuesta. Los grupos ácidos de la pectina le otorgan carga negativa en solución, mientras que la goma brea varía su potencial Z de positivo a negativo según el pH, y esto está probablemente relacionado al 6-8% de proteínas presentes en su composición. El objetivo del presente trabajo fue optimizar la formulación de complejos de polielectrólitos a base de pectina (P) y goma brea (GB). Se prepararon soluciones de P y GB al 1% p/v. La formulación de complejos de polielectrólitos se realizó mediante dos metodologías diferentes, en las que varió el pH de la GB, la relación P/GB y el pH final de las mezclas y se calculó el rendimiento de complejo obtenido. Los resultados indicaron que el rendimiento, depende del pH final de la solución y de la relación P/GB y no de la metodología empleada. El rendimiento máximo obtenido para las diferentes metodologías ensayadas fue del 45%.

Palabras Claves: Goma Brea, Pectina, Complejos de polielectrólitos

ABSTRACT

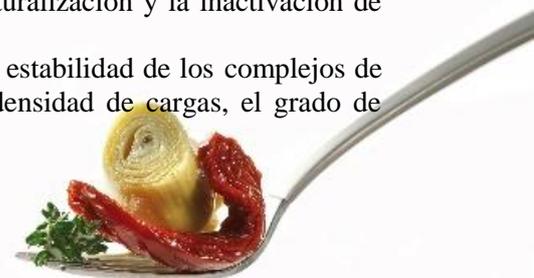
The polyelectrolytes are macromolecules with lots of charged functional groups or groups that can develop charge according to environmental conditions. Polyelectrolyte complexes are formed by mixing solutions of oppositely charged polyelectrolytes. The acid groups of pectin (P) give negative charge to the solution, while Brea gum (GB) varies its Z potential from positive to negative depending on the pH, and this is probably related to the 6-8% of protein in its composition. The aim of this work was to optimize the formulation of polyelectrolyte complexes based on P and BG. Solutions 1% w/v of GB and 1% w/v of P were prepared. Polyelectrolyte complex formulation was performed using two different methodologies varying pH of GB solution, P/GB ratio and the final pH of the mixtures. Polyelectrolyte complex yield was calculated. Results indicated that the performance depends on the final pH of the solution and the P/GB ratio and is not dependent on the methodology used. The maximum yield obtained for the tested methodologies was 45%.

Keywords: Brea Gum; Pectin; Polyelectrolyte complexes

INTRODUCCIÓN

Los polielectrólitos son macromoléculas que llevan un número relativamente grande de grupos funcionales que presentan carga o la pueden desarrollar según las condiciones del medio. Los complejos de polielectrólitos se forman mediante la mezcla de soluciones de polielectrólitos con carga opuesta, en la cual no intervienen agentes quelantes que puedan facilitar la formación de enlaces covalente y llevar a la formación de estructuras reticuladas (Luo y Wang 2014, Lankalapalli y Kolapalli, 2009). Las principales interacciones entre dos polielectrólitos, incluyen las interacciones electrostáticas fuertes pero reversibles, interacciones dipolo-dipolo, así como la formación de enlaces puente hidrógeno y enlaces hidrófobos. En contraste con los complejos químicamente reticulados, los complejos de polielectrólitos generalmente no presentan toxicidad y se consideran biocompatibles. Además, la mayoría de los polímeros sintéticos son inmunogénicos y la encapsulación de sustancias activas, como proteínas en estos sistemas de suministro implica condiciones de procesamiento severas que podrían causar la desnaturalización y la inactivación de las sustancias encapsuladas (Irina y Varlamov 2005).

En la formulación de este tipo de materiales, se debe tener en cuenta que la estabilidad de los complejos de polielectrólitos puede verse afectada por muchos factores, incluyendo la densidad de cargas, el grado de



ionización, el pH del medio de reacción, la concentración de polielectrolitos, la distribución de los grupos iónicos, el peso molecular, la relación de mezcla, el orden de la reacción de los polielectrolitos y el proceso de secado (Cooper et al., 2005).

La combinación de quitosano (policación), con diferentes polianiones, como alginato, pectina, gelano, entre otros, se ha empleado en la formación de complejos de polielectrolitos para diferentes aplicaciones, como por ejemplo, membranas fibrosas, películas, hidrogeles y micro/nanopartículas, además de diversas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas (Luo y Wang 2014). Por ejemplo, Maciel et al. (2014), formularon un biosensor de pH a base de complejos de polielectrolitos utilizando quitosano y pectina. Tsai et al. (2014) y Coimbra et al. (2011), evaluaron la combinación de quitosano y diferentes polianiones, con el objetivo de obtener complejos de polielectrolitos para aplicaciones médicas. Amin y Panhuis (2011) obtuvieron películas de complejos de polielectrolitos, a base de quitosano y gelano, mediante inmersión de las películas simples en la solución del polisacárido de carga opuesta y observaron importantes cambios en las propiedades mecánicas de los films.

Hasta el momento, el quitosano ha sido el polianión más utilizado para este tipo de materiales. Dado que la goma brea, una goma vegetal de la región, fue incorporada en el Código Alimentario Argentino como aditivo alimentario (Resolución Conjunta N° 222/2013 y 331/2013) y que presenta las características de un polianión en determinadas condiciones de pH, es posible su aplicación en la formulación de complejos de polielectrolitos en combinación con diferentes polianiones. El objetivo del presente trabajo fue determinar las mejores condiciones de preparación de complejos de polielectrolitos a base de pectina (P) y goma brea (GB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los complejos de polielectrolitos se formularon a base de pectina de bajo metoxilo (polianión), provista por GELFIX (LM-104-AS) y goma brea (policación) recolectada en la región del chaco salteño por comunidades wichis de la zona y donada a nuestro laboratorio. El exudado se purificó mediante un proceso simple de solución y secado con una molienda posterior hasta obtener un polvo fino para facilitar su uso.

Métodos

Determinación de Potencial Z

Se determinó el potencial Z de solución GB a diferentes pH, empleando un instrumento de medición de potencial Z (Zeta-Meter System 3.0+, USA). Para esto, se prepararon soluciones de GB al 0.01% a diferentes pH (2.0-5.5). También, se determinó el potencial de Z, de una solución de pectina al 0.01% a pH = 4.2 (natural). La fuerza iónica y el pH de las soluciones, se ajustaron empleando una solución de HCl 1N y una solución de KCl (10^{-4} M). El análisis se realizó a 25°C.

Formulación de PEC

Se prepararon soluciones de ambos polímeros al 1% p/v. La formulación de los complejos de polielectrolitos, se realizó mediante dos metodologías diferentes. En la primera, se ajustó el pH de las soluciones de GB a pH=2 y pH=3, siendo el pH inicial de la solución de P de 4.2. Las muestras se denominaron P/GB-2 y P/GB-3, respectivamente. Luego, se procedió a la mezcla de las soluciones en diferentes proporciones (**Tabla 1 y 2**), con agitación constante. Se dejó estabilizar el complejo durante 15 minutos y se determinó el pH final. Luego, se procedió a centrifugar las muestras a 3600 rpm para separar el complejo de polielectrolitos obtenido. El precipitado se secó en estufa a 45°C, hasta peso constante.

La segunda metodología empleada, consistió en mezclar las soluciones de P (pH = 4.2) y GB (pH = 4.1) en diferentes proporciones (**Tabla 3 y 4**) y agregar 1.0 mL (a) o 0.5 mL (b) de HCl (1N) y se determinó el pH final de la mezcla. Las muestras se denominaron P/GB-a y P/GB-b. Luego, se procedió a la obtención de los complejos de polielectrolitos mediante centrifugación y posterior secado en estufa.

El volumen de trabajo en todos los casos, fue de 50 mL. El pH de las soluciones, se determinó empleando un pH-metro marca Arcano (PHS-3E). Todas las muestras se realizaron por triplicado y a 25°C.

El rendimiento de los complejos de polielectrolitos se determinó a partir del peso de los geles recuperados y se calculó de acuerdo a la Ec. 1.

$$\%R = \frac{m_{\text{complejo}}}{(m_{\text{GB}} + m_{\text{P}})_1} \quad (1)$$



Donde, m_{complejo} , es la masa del complejo de polielectrólitos obtenida luego de la precipitación y posterior secado, y m_{GB} y m_{P} , son las masas iniciales de los polisacáridos. Cada experimento se realizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1**, se observa el potencial de las soluciones de GB en función del pH. La GB presenta un potencial Z positivo, por debajo de un pH = 3.7. El punto isoeléctrico, se sitúa entre 3.7 y 4.3, y por encima de este valor, el potencial de las soluciones de GB, presentan un potencial negativo. Este comportamiento está relacionado a la presencia de la fracción proteica que forman parte de la composición de la GB (8%, aproximadamente). Resultados similares, han sido observados en harinas de soja, que poseen proteínas globulares (Giancone et al. 2009). La solución de pectina en su pH natural, presenta un potencial Z de -27.43 mV, lo cual es consistente con la presencia de los grupos ácidos ionizables que forman parte de su estructura. Debido al protonado de los grupos ácidos, el potencial Z de la pectina disminuye a medida que desciende el pH de las soluciones. Maciel et al (2015), reportaron para la pectina un valor de potencial Z similar al obtenido a este pH.

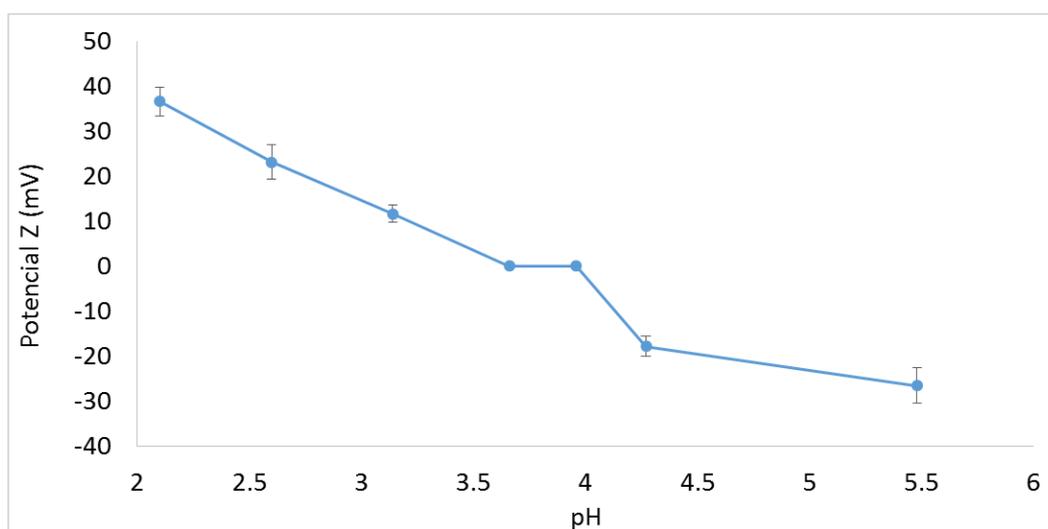


Figura 1. Potencial Z de la GB en función del pH

Con el fin de formar complejos a base de polielectrólitos, ambos polímeros tienen que encontrarse ionizados y poseer cargas opuestas. Esto significa que la formación de complejos de polielectrólitos entre una polibase débil y un poliácido débil se produce más ampliamente en el intervalo de pH entre el pKa de los dos polímeros. En este intervalo de pH, más de la mitad de los grupos de ambos polímeros se encuentran ionizados (Coimbra et al. 2011). Ya que la formación de complejos entre polielectrólitos es impulsado principalmente por interacciones de Coulomb, el pH de la solución de polisacárido influye en su densidad de carga, y por lo tanto, en el mecanismo de formación de complejos y las propiedades de los complejos de polielectrólitos resultantes (Vidal et al 2005, Sun et al 2008). Otros parámetros que podrían afectar a la formación de este tipo de complejos, son la distribución de carga sobre las cadenas de los polisacáridos, la posición de los grupos iónicos en las cadenas y la flexibilidad de la cadena (Hamman, 2010). Para complejos de polielectrólitos solubles en agua, cuando los polielectrólitos poseen la misma densidad de carga se observa la formación de soluciones turbias de compuestos polielectrólitos debido a la separación de fases.

En nuestro caso, cuando se mezclaron las soluciones de GB y P se observó la formación de un precipitado. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que indican que a menudo se producen complejos de polielectrólitos insolubles, debido a las fuertes interacciones iónicas entre los polianiones y los policationes (Bigucci et al 2008, Coimbra et al 2011). Según Tsai et al. (2014). Los complejos de polielectrólitos son generalmente solubles en agua y forman soluciones homogéneas cuando las densidades de cargas positivas en los policationes y cargas negativas de los polianiones no están equilibradas.

En las **Tablas 1 y 2**, se presentan los resultados obtenidos empleando la metodología 1, donde el rendimiento de los complejos de polielectrólitos presenta un máximo a medida que cambia la relación entre la P y la GB. En este caso, el pH de la solución final y en consecuencia, el potencial Z de ambos polisacáridos dependen



del polímero que se encuentra en mayor proporción. A medida que aumenta la cantidad de pectina, aumenta el rendimiento hasta cierta relación P/GB, donde dejan de obtenerse complejos de polielectrólitos y en cambio, se obtiene una solución de macromoléculas. En esta situación, el pH de la solución de GB se aproxima al punto isoelectrico de las proteínas que contiene y cambia su característica iónica, encontrándose en esas condiciones con una densidad de carga negativa, al igual que la P. Las repulsiones electrostáticas entre ellos generan la estabilización de la solución coloidal que se detecta para pH superiores a 3 (**Tabla 1**).

Tabla 1. %Rendimiento y pH final de la solución obtenida, de las muestras preparadas por el método 1 (P/GB-2).

R: P/GB	% Rendimiento	pH final
1/9	3.14 ± 1.47	2.03
2/8	13.83 ± 2.76	2.07
3/7	20.10 ± 3.66	2.36
4/6	31.34 ± 1.53	2.43
5/5	42.38 ± 1.99	2.54
6/4	45.61 ± 2.71	2.59
7/3	0.99 ± 1.13	2.88
8/2	0.44 ± 1.13	3.34
9/1	-	3.59

De acuerdo con Maciel et al (2015), los mejores rendimientos de complejos de polielectrólitos, se obtienen cuando el potencial Z obtenido de la mezcla de polímeros es cercana a 0. Como era de esperarse, el pH de la solución aumenta a medida que disminuye la cantidad de GB en la solución. Esto indica que a medida que aumenta la cantidad de P en la solución, la cantidad de GB no es suficiente para neutralizar la carga negativa del polianión. Superado el valor de pH = 3.7, el potencial Z de la GB, pasa a tener un valor negativo, al igual que la pectina, presentando ambos polímeros igual carga iónica y por lo tanto, las repulsiones electrostáticas estabilizan la solución, impidiéndose la formación del complejo.

Debido a que la formación de complejos de polielectrólitos es dependiente de la densidad de carga positiva de la GB y negativa de la pectina y por lo tanto del pH de la solución, se observa que la relación P/GB necesaria para que se formen los complejos, varía de acuerdo al pH inicial de la GB y por lo tanto del pH final de la mezcla.

Tabla 2. %Rendimiento y pH final de la solución obtenida, de las muestras preparadas por el método 1 (P/GB-3).

R: P/GB	% Rendimiento	pH final
1/9	12.64 ± 0.43	2.70
2/8	24.49 ± 1.86	2.85
3/7	33.28 ± 3.96	3.16
4/6	41.46 ± 2.27	3.26
5/5	-	3.62
6/4	-	3.73
7/3	-	3.91
8/2	-	4.12
9/1	-	4.12

En la **Figura 2**, se observa que el máximo rendimiento de complejos de polielectrólitos se obtiene cuando la GB tiene inicialmente un pH = 2, y se da para una relación P/GB = 1.5, mientras que, para las muestras preparadas a partir de la solución de GB con inicialmente un pH = 3, el mayor rendimiento se produce para una relación P/GB = 0.67. Esto indica, que cuando la GB posee un pH más alto, la cantidad de grupos cargados positivamente disminuye. Como consecuencia, es necesario que la solución formadora del complejo de polielectrólitos posea una relación más elevada en GB para interactuar con la pectina.



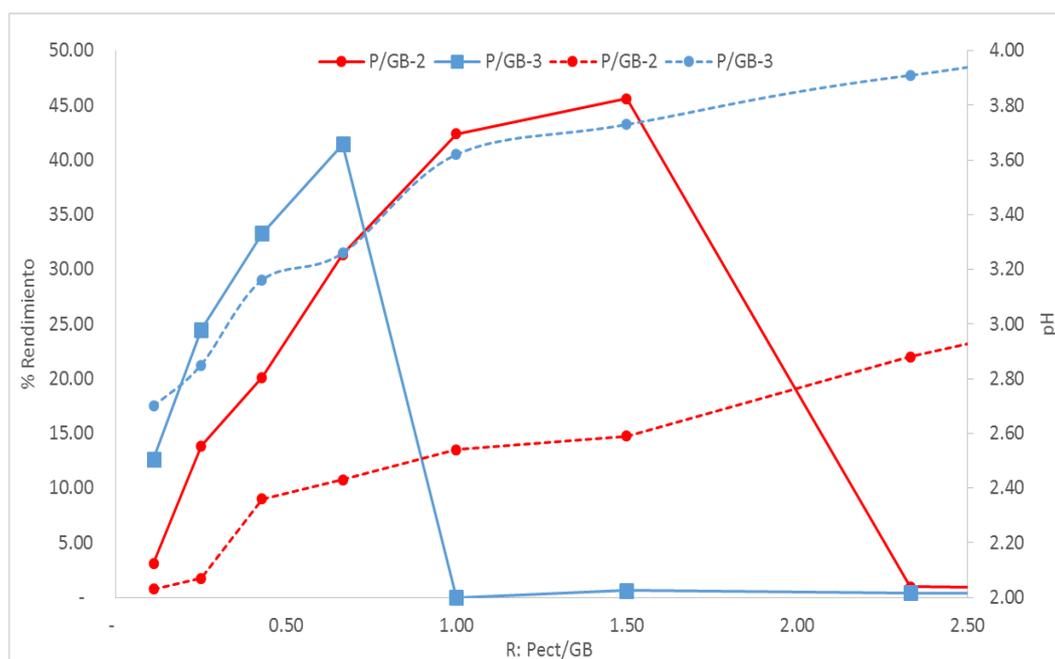


Figura 2. Relación P/GB vs. % Rendimiento (—) y pH (----)de las muestras preparadas por el método 1.

Lo mencionado previamente, se hace más evidente al emplear la metodología 2 (Tabla 3 y 4). En este caso, se parte de una solución de P con un pH = 4.2 y de GB con un pH= 4.1, y luego de la mezcla, se procede a disminuir el pH incorporando 1mL y 0.5mL de HCl 1N. En este caso, se observa que el pH de las soluciones para las muestras P/GB-a, es cercano a 2.5 y para las muestras P/GB-b, es cercano a 3. Se detecta un leve aumento del pH a medida que aumenta la cantidad de P en la mezcla.

Tabla 3. %Rendimiento y pH final de la solución obtenida, de las muestras preparadas por el método 2 (P/GB-a).

R: P/GB	% Rendimiento	pH
1/9	11.22 ± 1.19	2.44
2/8	19.65 ± 2.13	2.52
3/7	26.03 ± 1.08	2.52
4/6	31.49 ± 1.52	2.54
5/5	37.15 ± 1.46	2.52
6/4	40.93 ± 1.09	2.52
7/3	43.19 ± 1.34	2.70
8/2	-	3.15
9/1	-	3.31

Nuevamente, el rendimiento de complejos de polielectrólitos recuperado depende de la relación P/GB. Al igual que en el caso anterior, a medida que aumenta la cantidad de pectina, el rendimiento obtenido es mayor, hasta que pasado cierto valor de pH, dejan de obtenerse complejos debido al cambio de densidad de carga de la GB.

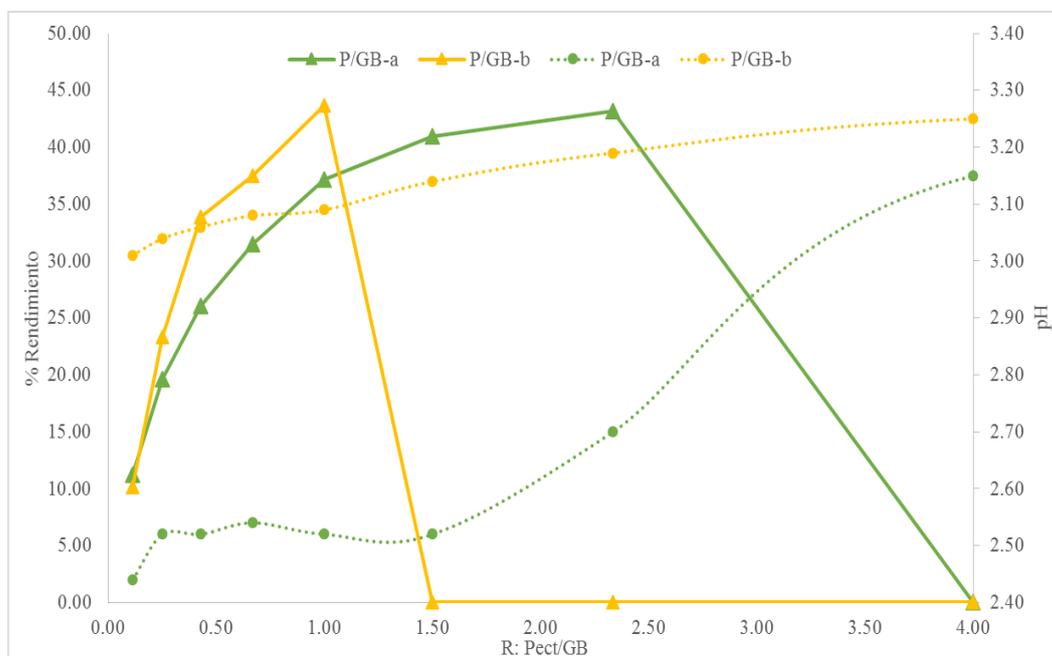


Tabla 4. %Rendimiento y pH final de la solución obtenida, de las muestras preparadas por el método 2 (P/GB-b).

R: P/GB	% Rendimiento	pH
1/9	10.17 ± 1.47	3.01
2/8	23.30 ± 1.31	3.04
3/7	33.90 ± 1.22	3.06
4/6	37.52 ± 1.75	3.08
5/5	43.69 ± 2.01	3.09
6/4	-	3.14
7/3	-	3.19
8/2	-	3.25
9/1	-	3.29

Esto indica que la relación entre ambos polímeros y el pH son determinantes para la formación de los complejos. A medida que se combinan ambos polímeros, las interacciones iónicas generan agregados de mayor peso que precipitan, quedando en solución aquellas cadenas de polímeros que no forman complejos.

En la **Figura 3**, se observa que cuando se incorpora un 1mL de HCl, se obtienen los complejos de polielectrolitos hasta una relación P/GB = 2.33, y cuando se agregan 0.5mL, se obtienen complejos hasta una relación P/GB = 1.00. Pasado estos valores, los polímeros permanecen en solución, indicando que no existe interacción entre ellos. Esto puede deberse a que la cantidad de GB cargada positivamente, capaz de interactuar con la pectina, es muy pequeña, resultando despreciable la cantidad complejos formados. Además, el potencial Z de la pectina, también depende del pH de la solución. A medida que el pH es menor, el potencial Z de la pectina se aproxima a 0 debido a que los grupos ácidos se encuentran protonados, perdiendo su carga neta negativa. Por ello, para pH en el rango 2.5-3, el rendimiento aumenta. Por el contrario, para valores de pH superiores a 3.5, ambos polímeros comparten la misma carga eléctrica y la repulsión entre ellos genera que se mantengan en una solución coloidal estable.

**Figura 3.** Relación P/GB vs. Rendimiento (—) y pH (----) de las muestras preparadas por el método 2.

CONCLUSIONES

Se formularon complejos polielectrolitos a partir de la combinación a diferentes relaciones de pectina (polianión) y goma brea (polcatión), a partir de dos metodologías diferentes. Los resultados indican que el rendimiento de los complejos de polielectrolitos, depende del pH de la goma brea y del pH final de la solución y de la relación pectina/goma brea y no de la metodología empleada. Por encima de un pH final de 3.5, no se observa la formación complejos de polielectrolitos, ya que por encima de este valor, el potencial Z de la goma brea es negativo al igual que el de la pectina, por lo tanto, en vez de formarse un complejo de polieléctrolito se obtiene una solución coloidal estabilizada por las repulsiones electrostáticas. El pH de la solución final depende de la cantidad de pectina presente en la mezcla. El rendimiento máximo obtenido para las diferentes metodologías ensayadas fue del 45%.

BIBLIOGRAFÍA

- Amin KAM, Panhuis M. In Het. 2011. Polyelectrolyte complex materials from chitosan and gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, 86(1): 352–358.
- Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, et al. 2008. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 35: 435–441.
- Coimbra P, Ferreira P, de Sousa HC, Batista P, Rodrigues MA, Correia IJ, Gil MH. 2011. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1): 112–118.
- Cooper CL, Dubin PL, Kayitmazer AB, Turksen S. 2005. Polyelectrolyte–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(1-2): 52–78.
- Giancone T, Torrieri E, Masi P, Michon C. 2009. Protein-polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin-soy flour mixture. *Food Hydrocolloids*, 23(5): 1263–1269.
- Hamman JH. 2010. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine Drugs*, 8(4): 1305–1322
- Il'ina AV, Varlamov VP. 2005. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*: 41(1), 5-11.
- Hankalapalli S, Kolapalli VRM. 2009. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian J Pharm Sci*. 71(5): 481–487.
- Luo Y, Wang Q. 2014. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64: 353–367.
- Maciel VBV, Yoshida CMP, Franco TT. 2015. Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator. *Carbohydrate Polymers*, 132: 537–545.
- Resolución Conjunta N° 222/2013 y 331/2013 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Boletín Oficial del 16/08/2013
- Sun W, Mao S, Mei D, Kissel T. 2008. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and enoxaparin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2): 417–425.
- Tsai R.-Y, Chen P-W, Kuo T-Y, Lin C-M, Wang D-M, Hsien T-Y, Hsieh H-J. 2014. Chitosan/pectin/gum Arabic polyelectrolyte complex: Process-dependent appearance, microstructure analysis and its application. *Carbohydrate Polymers*, 101: 752–759.
- Vidal RRL, Fagundes FP, Menezes SMC, Ruiz NMD, Garcia SRB. 2005. Solution properties of partially hydrolysed polyacrylamide and chitosan mixed solutions. *Macromolecular Symposia*, 229(1): 118–126.



Redescubrimiento de almidón de mandioca nativo y acetilado para la conservación de frutas de quinoto (KUMQUAT)

Trela V. D.¹, Kachuk L. L.², Albani O. A.¹, Ramallo L. A.¹

¹Instituto de Materiales de Misiones (CONICET – UNaM). FCEQyN-UNaM. Felix de Azara 1552. Posadas, Misiones, Argentina.

²FCEQyN– UNaM. Felix de Azara 1552. Posadas, Misiones, Argentina.

valeriatrela@gmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de recubrimientos biodegradables de almidón de mandioca nativo y acetilado con diferentes grados de sustitución (GS) en la calidad de los frutos de quinoto durante el almacenamiento a 8°C. Se evaluó el almacenamiento de fruta de quinoto con 3 tratamientos diferentes: T1: recubrimiento con almidón nativo, T2: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,08) y T3: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,9) y una muestra sin recubrir que es el control (C). Los recubrimientos se elaboraron utilizando 4 g de almidón, 0,8 g de glicerol, 0,3 g de sorbato de potasio, y ácido cítrico (para ajustar el pH a 4,5), cada 100 g de solución. El almacenamiento se llevó a cabo en recipientes cerrados y en condiciones constantes de temperatura (8±1°C), y humedad relativa (75%) durante 31 días. Durante este período se evaluó pérdida de peso, color, apariencia, sólidos solubles y firmeza. Se observó diferencia significativa (p<0,05) en la pérdida de peso entre las frutas recubiertas y el control. Se observó una mayor firmeza al finalizar el ensayo en las frutas recubiertas con T3.

Palabras clave: quinotos, almidón de mandioca acetilado, recubrimiento biodegradable, almacenamiento.

ABSTRACT

In this paper the effect of the application of biodegradable coatings made from native and acetylated cassava starch with different degrees of substitution (DS) was evaluated in the quality of kumquat fruits, during storage at 8 °C. Storage kumquat fruit was evaluated with 3 different treatments: T1: native starch coating, T2: acetylated starch coating (DS = 0.08) and T3: acetylated starch coating (DS = 0.9) and a uncoated sample is the control (C). The coatings are made using 4 g of starch, 0.8 g glycerol, 0.3 g of potassium sorbate and citric acid (to adjust pH to 4.5) per 100 g of solution. Storage is carried out in closed containers at constant temperature (8 ± 1°C) and relative humidity (75%) for 31 days. During this period of weight loss, color, appearance, soluble solids and firmness was evaluated. Significant difference (p <0.05) was observed in weight loss between the coated and control fruits. Greater firmness after the trial in fruits coated with T3 was observed.

Key words: kumquats, acetylated cassava starch, biodegradable coating storage.

INTRODUCCION

La planta de quinoto (kumquat) es conocida comúnmente como naranjo enano. Es el más pequeño de los frutos cítricos y por lo general se consume crudo como una fruta entera. Pueden prepararse como mermeladas, en ensaladas de fruta, en conservas con jarabe de azúcar o bien, se utilizan como decoración.

El quinoto también es una excelente fuente de nutrientes y fitoquímicos, incluyendo el ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides y aceites esenciales. Los aceites esenciales representan un valor agregado para esta fruta ya que, además de su contribución al sabor, desempeñan un papel importante en la salud humana (Schirra et al. 2008). En relación a la vida útil es altamente perecedero, es susceptible a la descomposición debido a la alta transpiración. Las pérdidas debida a los microorganismos son causadas principalmente por *Penicillium spp.* La manera habitual para extender la vida poscosecha de kumquat durante algunas semanas, es el almacenamiento en frío (Chalutz et al, 1989).

Una solución para superar la corta vida útil de frutas y vegetales frescos y mínimamente procesados es el uso de películas comestibles. Los cuales pueden ser utilizados junto con agentes antimicrobianos para aumentar la seguridad de los productos alimenticios frescos (Ciolacu et al. 2014). Los recubrimientos comestibles



pueden proteger a las frutas y verduras de la deshidratación debido a sus propiedades de barrera contra la humedad, produciendo un aumento en la vida útil de los productos mínimamente procesados (Liming Zhang et al. 2009).

Los polímeros más comunes en la formulación de las películas comestibles son polisacáridos (almidón, celulosa y derivados, extracto de algas marinas, quitosano, pectina), proteínas (caseína, gelatina) y lípidos (ceras), que pueden ser utilizados solos o en mezclas (Campos et al., 2011).

El almidón es uno de los materiales más usados en la formulación de películas biodegradables y recubrimientos comestibles (Chiumarelli et al. 2010).

Trela et al. (2014) evaluaron el comportamiento de rodajas de carambola recubiertas con almidón de mandioca nativo durante su almacenamiento refrigerado. Los mejores resultados, en cuanto a pérdida de peso, mayor uniformidad y mejor apariencia del recubrimiento, se obtuvieron empleando una concentración de almidón al 4%.

El almidón nativo se caracteriza por su hidrofiliidad, por tener pobres propiedades mecánicas cuando es afectado por la humedad relativa del ambiente donde se almacenan (Xu y Hanna, 2005). La modificación del almidón puede superar estas deficiencias por medio de la alteración de la estructura que afectan a los enlaces de hidrógeno de amilosa y amilopectina de una manera controlable para mejorar y extender la aplicación de almidón. El entrecruzamiento y la eterificación son las modificaciones más importantes en la industria del almidón (Liming et al. 2009). El éster de almidón más típico es el almidón acetilado, que se utiliza principalmente por sus propiedades específicas derivadas de los grupos de sustitución. Parte de los grupos hidroxilo de monómeros de glucosa son reemplazados por grupos acetilo, modificando la estructura molecular y por lo tanto las propiedades y aplicaciones de almidón (Larotonda et al., 2004). Estos principales cambios afectan a las propiedades morfológicas, reológicas y cristalinas, provocando también alteraciones en la temperatura de gelatinización y estabilidad de los geles.

Los almidones acetilados con grado de sustitución entre 0,01 y 0,2 se utilizan por sus propiedades fisicoquímicas como formadores de película y en espesamiento, estabilización y texturizado de alimentos (Chi et al, 2008). Los almidones acetilados con grado de sustitución más elevado, comprendido entre 1,7 y 3 se caracterizan por su hidrofobicidad, solubilidad en solventes orgánicos y termoplaticidad. Sus principales aplicaciones no son en el área alimentaria, sino en adhesivos, plásticos biodegradables, filtros de cigarrillos (Shogren R.L., 2003) y en la liberación controlada de productos farmacéuticos (Kulkarni et al. 2015).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de recubrimientos biodegradables de almidón de mandioca nativo y acetilado con diferentes grados de sustitución (GS), en la preservación de la calidad de frutas de quinotos durante el almacenamiento refrigerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados para la elaboración de los recubrimientos fueron: almidón de mandioca nativo (ALDEMA, Puerto Rico, Misiones, Argentina), almidón acetilado en el laboratorio, glicerol (Anedra, Buenos Aires, Argentina), sorbato de Potasio (Anedra, Buenos Aires, Argentina) y ácido cítrico (Cicarelli, Santa Fe, Argentina). Las frutas de quinoto se cosecharon de árboles del pueblo de Gobernador G. López perteneciente al departamento de Leandro N. Alem, provincia de Misiones.

Acondicionamiento de las frutas

Luego de la cosecha, las frutas maduras de quinoto ($10,8 \pm 0,5$ °Brix, pH igual a $2,40 \pm 0,0$) se trasladaron al laboratorio donde se seleccionaron según el color y tamaño. Se lavaron con agua potable y desinfectaron con solución al 5 ppm de hipoclorito de sodio durante 2 minutos dejando escurrir durante 1 hora.

Recubrimiento

Se prepararon soluciones para el recubrimiento, utilizando 4 g de almidón, 0,8 g de glicerol, 0,3 g de sorbato de potasio y ácido cítrico (para ajustar el pH a 4,5) por cada 100 g de solución. Las mismas fueron gelatinizadas por calentamiento a 90°C durante 20 minutos con agitación constante utilizando un shaker termostático (Dubnoff, Argentina). Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente para aplicarlas sobre las frutas mediante el método de inmersión durante un minuto. Luego de recubrir las frutas, las mismas se secaron con flujo de aire a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente los frutos se almacenaron a temperatura de refrigeración (8 ± 1 °C) con una humedad relativa del 75% durante el período de ensayo. Para mantener la humedad relativa constante se utilizó un recipiente hermético con solución saturada de NaCl.



Pérdida de peso

Se utilizó una balanza analítica con una desviación de $\pm 0,0001$ g. Para el cálculo se tuvo en cuenta la siguiente ecuación:

$$P_p = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

Donde:

P_p = Pérdida de masa (g)

P_i = Peso inicial (g)

P_f = Peso final (g)

Sólidos solubles totales

Las medidas se realizaron directamente sobre el jugo de las frutas, utilizando un refractómetro Abbe (ICSA-OPTIC, modelo WY 1^a), calibrado con agua destilada. Los ensayos se realizaron en 4 frutas por cada uno de los tratamientos al final del periodo de almacenamiento.

Evaluación de textura

Las propiedades mecánicas fueron evaluadas con un texturómetro universal (TA.XT2 Texture Analyser, Stable Micro Systems, USA), con una celda de carga de 5 N. Se realizaron ensayos de compresión uniaxial a las muestras mediante una sonda de acero inoxidable, de sección circular, de 75 mm de diámetro, a velocidad constante de 3 mm/s, hasta un nivel de deformación del 60% del espesor de la muestra. Los ensayos de compresión se realizaron sobre las frutas enteras por sextuplicado al final del periodo de almacenamiento. Los resultados se informaron como la fuerza en Newton (N).

Medición de parámetros de color

Se realizaron mediciones de los parámetros de color L^* , a^* y b^* (Sistema HunterLab) con un medidor de color MiniScan® EZ HunterLab (Hunter Associates Laboratory, Inc.). Los valores presentados corresponden a la media de cuatro lecturas.

Con estos valores se calcularon los parámetros ángulo Hue, Chroma y variación total del color ΔE a través de las Ecuaciones (1) y (2):

$$Hue = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right), (cuando a^* > 0) \quad (1)$$

$$Chroma = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

Análisis Estadístico

El análisis de varianza y los test de rangos múltiples (LSD: método de las mínimas diferencias de Fisher) fueron calculadas usando el software Statgraphics Centurión (2009). Las diferencias entre las medias fueron consideradas a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1** se muestran las fotos de los quinotos al final del almacenamiento, recubiertos con los distintos tratamientos: T1, T2 y T3 y la fruta sin recubrir (control). A partir de estas imágenes se puede destacar que, las frutas recubiertas con almidón nativo (T1) presentaron una superficie más brillante respecto a los demás recubrimientos, resultando más opacas las frutas que fueron recubiertas con el almidón acetilado de mayor grado de sustitución (T3).

C

T1

T2

T3



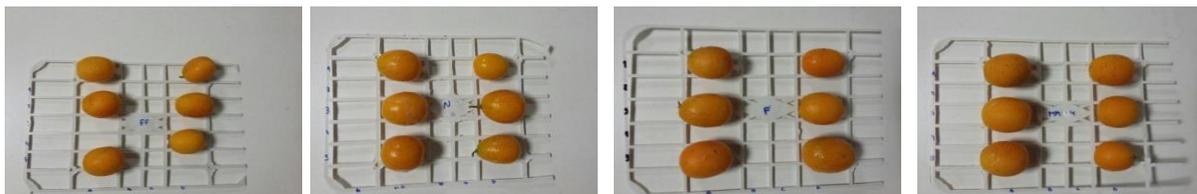


Figura 1: Fotografías de los frutos de quinoto al final del almacenamiento (31 días a 8°C).
C: Control, T1: recubrimiento con almidón nativo, T2: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,08) y T3: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,9).

Pérdida de peso

Los quinotos recubiertos mostraron menor pérdida de peso al finalizar el ensayo que la muestra control, como se detalla en la **Figura 2**. El análisis de estos resultados señala que hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos ($p > 0,05$), no habiendo diferencia significativa entre los diferentes recubrimientos. Las frutas recubiertas mostraron menor pérdida de peso al finalizar el ensayo en un porcentaje de $7,23 \pm 0,32\%$; $8,44 \pm 1,10\%$ y $7,69 \pm 0,96\%$ para los tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente; el control tuvo una pérdida de peso del $11,10 \pm 0,90\%$. Esto indica que los recubrimientos dificultan la deshidratación de las frutas durante el almacenamiento.

Chiumarelli et al. (2010), estudiaron el almacenamiento en rebanadas de mango y encontraron una menor la pérdida de peso en aquellas frutas que fueron recubiertas con almidón de mandioca y ácido cítrico. No observaron diferencias significativas entre la muestra control y las recubiertas con almidón de mandioca, ácido cítrico y glicerol. Mali y Grossmann (2003) encontraron resultados similares en frutillas recubiertas con almidón de batata, donde el efecto del recubrimiento produjo una menor pérdida de peso durante el almacenamiento respecto a las frutas sin recubrir.

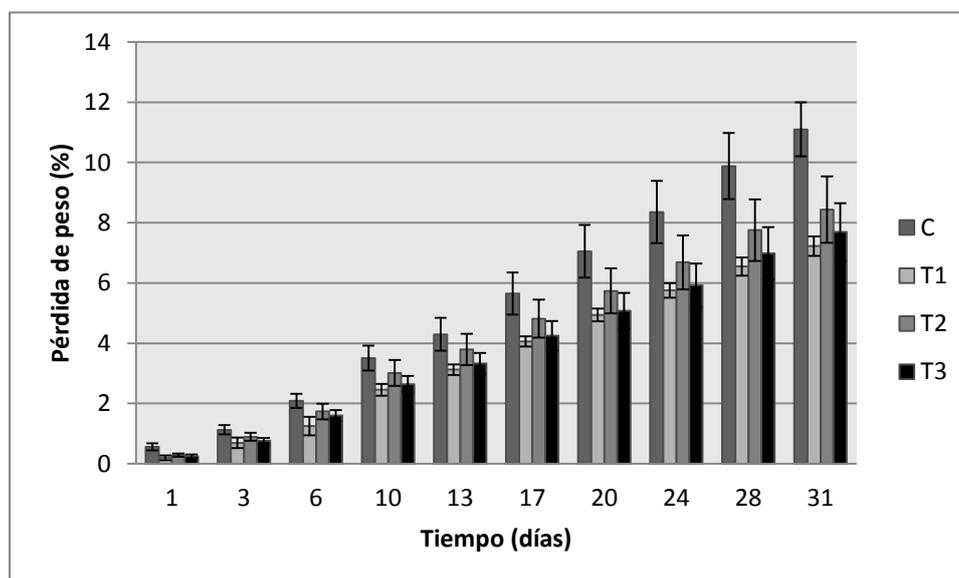


Figura 2: Pérdida de peso de frutas de quinoto con y sin recubrimiento durante el almacenamiento durante 31 días a 8°C.

C: Control, T1: recubrimiento con almidón nativo, T2: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,08) y T3: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,9).

Sólidos solubles totales

La **Figura 3** demuestra que no se evidenciaron diferencias significativas en sólidos solubles entre el control y las frutas recubiertas al final del almacenamiento.



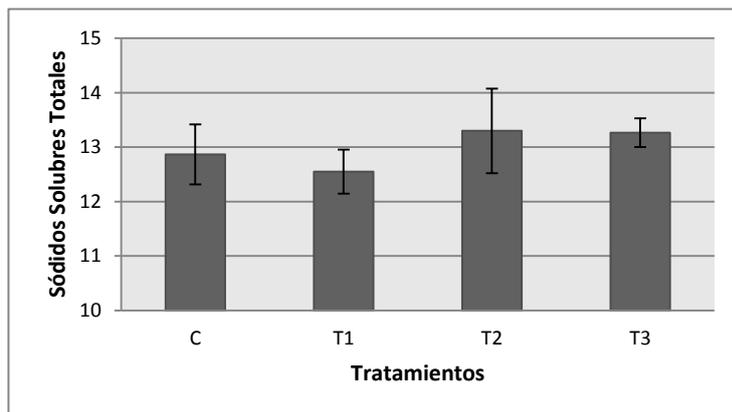


Figura 3: Sólidos solubles totales de quinoto al final del almacenamiento.

C: Control, T1: recubrimiento con almidón nativo, T2: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,08) y T3: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,9).

Firmeza

Los resultados de firmeza se presentan en la **Figura 4**. Los mismos demuestran que no hay diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la fruta sin recubrir y las recubiertas con T1 y T2. Se observa mayor firmeza en la fruta recubierta con almidón acetilado de mayor grado de sustitución (T3) respecto a los demás recubrimientos y al control.

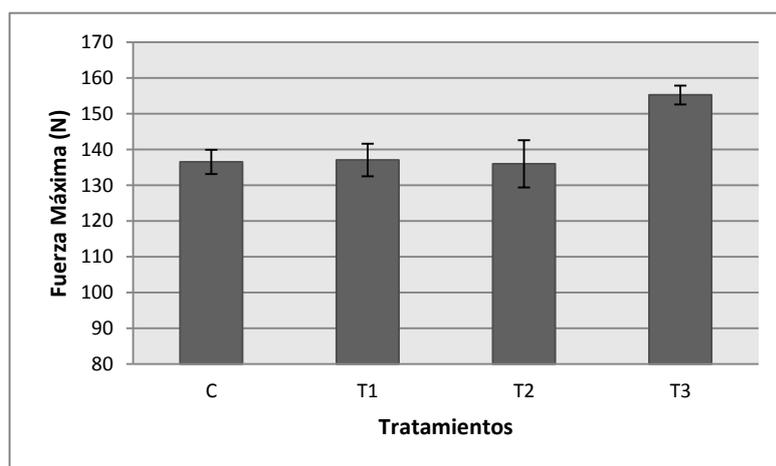


Figura 4: Fuerza máxima de quinoto al final del almacenamiento (31 días a 8°C).

C: Control, T1: recubrimiento con almidón nativo, T2: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,08) y T3: recubrimiento con almidón acetilado (GS=0,9).

Variación del color

La aplicación de los recubrimientos no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de L^* y b^* luego de los 31 días de almacenamiento. Esto demuestra que no hubo cambios en la luminosidad y en la coloración amarilla. Con respecto al parámetro de color a^* se observó que hubo una ligera disminución tanto en la fruta sin recubrir como en las recubiertas encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la fruta fresca (control) y las recubiertas con almidón acetilado (T2 y T3) luego del almacenamiento (**Tabla 2**). Esto indica que las frutas se volvieron levemente menos rojizas.

Se observó una reducción significativa en el parámetro Chroma a lo largo del almacenamiento para todos los recubrimientos. Sin embargo, no hubo una disminución significativa para la fruta fresca. Esta reducción fue más pronunciada para las muestras recubiertas con almidón nativo. Según Pomeranz y Meloan (1994), chroma C^* es una medida de la saturación, la intensidad de pureza o color, el cual cambia desde la periferia (colores



vivos o limpios) hacia el centro es decir, se vuelve en tonalidades más grises o apagadas. Por lo tanto, los cambios en estos valores están relacionados con proceso de maduración y los efectos de procesamiento.

El efecto de recubrimientos comestibles sobre la conservación de frutas de color también fue observado por otros investigadores. Según Chien y otros (2007), el uso de recubrimientos de quitosano en rebanadas de mango no cambió el color original de la fruta y también se retardó el oscurecimiento, demostrando una mejor conservación del color de los mangos durante el almacenamiento. García y otros (1998) informaron que los recubrimientos de almidón mantienen el color en las muestras de fresa durante los primeros 8 días del almacenamiento, demostrando una tasa de maduración más lenta en las frutas recubiertas.

En todas las muestras almacenadas se observó que hubo un aumento en el ángulo Hue durante el almacenamiento. Este aumento fue mayor en las frutas recubiertas, en 85,2%, 107,7% y 63,3% para los tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente. Esto indica que el recubrimiento con almidón alteró la tonalidad de las frutas. De igual manera, se observó que hubo un aumento en el ΔE en mayor medida en las frutas recubiertas.

Tabla 2: Valores promedio \pm Variación Standard del parámetro a^* de color de quinotos durante el almacenamiento.

Tratamientos	a^*	
	Día 0	Día 31
T1 (Fruta Fresca)	24,74 \pm 4,00	-
T2	35,65 \pm 2,21	4,96 \pm 4,53
T3	37,36 \pm 3,18	5,30 \pm 1,00
T4	33,32 \pm 2,39	8,86 \pm 2,49

Tabla 3: Valores promedio \pm Variación Standard de los parámetros HUE, CHOMA y ΔE de color de quinotos durante el periodo de almacenamiento

Tratamientos	HUE		CHROMA		ΔE	
	Día 0	Día 31	Día 0	Día 31	Día 0	Día 31
T1 (Fruta Fresca)	57,72 \pm 6,58	86,70 \pm 1,77	45,94 \pm 2,76	41,54 \pm 4,29	8,38 \pm 4,02	25,23 \pm 4,96
T2	44,54 \pm 3,75	82,48 \pm 5,23	50,79 \pm 1,43	41,62 \pm 2,59	8,89 \pm 3,87	31,89 \pm 6,08
T3	39,97 \pm 6,03	83,02 \pm 1,14	49,02 \pm 1,76	42,61 \pm 2,53	6,73 \pm 2,96	35,29 \pm 5,86
T4	47,71 \pm 2,14	77,92 \pm 2,98	49,52 \pm 2,00	43,19 \pm 2,96	8,38 \pm 3,49	28,42 \pm 5,43

CONCLUSIONES

Del presente trabajo se puede concluir que los recubrimientos ensayados redujeron la pérdida de peso de la fruta durante el almacenamiento, sin registrarse diferencias significativas entre los resultados obtenidos con almidón nativo y con los almidones acetilados a diferentes grados de sustitución.

Se observó mayor firmeza en las frutas recubiertas con almidón acetilado de mayor grado de sustitución respecto a los demás recubrimientos y al control.

En cuanto a la apariencia, los quinotos recubiertos con almidón nativo presentaron más brillo que las frutas ensayadas con los demás tratamientos y el control.

BIBLIOGRAFÍA

Campos C. A.; Gerschenson L. N.; Flores S. K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. Food and Bioprocess Technology. 4, 849–875.

Chalutz, E.; Lomenic, E.; Waks, J. Physiological and pathological observations on the postharvest behaviour of kumquat fruit. Trop. Sci. 1989, 29, 199–206.



- Chi H, Xu K, Wu X, Chen Q, Xue D, Song C, Zhang W, Wang P. 2008. Effect of acetylation on the properties of corn starch. *Food Chemistry*, 106: 923–928.
- Chiumarelli M., Pereira LM., Ferrari CC., Sarantópoulos C., Hubinger MD. 2010. Cassava Starch Coating and Citric Acid to Preserve Quality Parameters of Fresh-Cut “Tommy Atkins” Mango *Journal of Food Science*, 75: 297-304.
- Ciolicu L, Nicolau AI, Hoorfar J. 2014. Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. In J. Hoorfar (Ed.). *Global safety of fresh produce* Cambridge: Woodhead publisher. 233-234.
- Larotonda FDS, Matsui KN, Sobral PJA, Laurindo JB. 2005. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. *Journal of Food Engineering*, 71: 394–402.
- Kulkarni SD, Sinha BN, Kumar KJ. 2015. Physicochemical and drug release characteristics of acetylated starches of five *Lagenaria siceraria* cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 1005–1012.
- Liming Z, Weiguang X, Xi Z, Ying L, Wenyuan G. 2009. Study on the morphology, crystalline structure and thermal properties of yellow ginger starch acetates with different degrees of substitution. *Thermochimica Acta*, 495: 57–62.
- Mali S., Grossmann ME. 2003. Effects of Yam Starch Films on Storability and Quality of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem*, 51: 7005-7011.
- Schirra M, Palma A, D’aquino S, Angioni A, Minello EV, Melis M, Cabras P. 2008. Influence of postharvest hot water treatment on nutritional and functional properties of kumquat (*Fortunella japonica* Lour. Swingle Cv. Ovale) fruit. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56: 455-460.
- Shogren RL. 2003. Rapid preparation of starch esters by high temperature/pressure reaction. *Carbohydrate Polymers*, 52: 319–326.
- Trela VD, Albani OA, Ramallo LA. 2014. Aplicación de recubrimientos de almidón de mandioca para la conservación de frutas de carambola. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina.
- Xu Y, Hanna MA. 2005. Preparation and properties of biodegradable foams from starch acetate and poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate). *Carbohydrate Polymers*, 59: 521–529.



Detección de betalactámicos en leche mediante *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus*

Tumini, M.¹; Nagel, O.¹; Molina, M.P.²; Althaus, R.L.^{1*}

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805- (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

² Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n (46021) Valencia, España.

*e-mail: ralthaus@fcv.unl.edu.ar

RESUMEN

Los antibióticos betalactámicos se utilizan preferentemente para el tratamiento de vacas con mastitis. La Federación Internacional de Lechería recomienda métodos microbiológicos que utilicen *Geobacillus stearothermophilus* para el control de estos antimicrobianos en leche. Sin embargo, este microorganismo no presenta adecuados límites de detección para todos los betalactámicos, por lo que se plantea llevar a cabo estudios con otras especies de *Geobacillus* a fin de detectar betalactámicos a valores inferiores a los LMRs. Por ello, el objetivo del trabajo fue evaluar y comparar los límites de detección de betalactámicos mediante dos bioensayos que contienen *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus*. Se elaboraron 16 bioensayos en placas de microtitulación conteniendo esporas de *G. kaustophilus* ($1,6 \cdot 10^5$ esporas/ml) y 16 bioensayos con *G. stearothermophilus* ($2,0 \cdot 10^6$ esporas/ml) en medio agarizado. El medio de cultivo estuvo compuesto por Agar Mueller Hinton (38 g/l), glucosa (10 g/l), Negro Brillante (200 mg/l) y Azul de toluidina (10 mg/l). Se calcularon los límites de detección de penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, cloxacilina, cefalexina, cefoperazone y ceftiofur en leche. Se concluye que el bioensayo con *G. kaustophilus* presenta límites de detección más elevados que bioensayo con *G. stearothermophilus*. Se deberían investigar otras bacterias termofílicas esporuladas para mejorar los límites de detección.

Palabras Clave: bioensayo; *Geobacillus kaustophilus*; *Geobacillus stearothermophilus*; test microbiológico; leche.

203

ABSTRACT

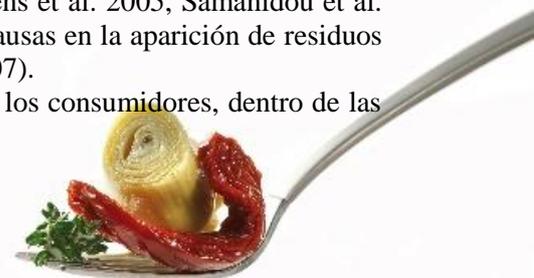
Beta-lactam antibiotics are preferably used for the treatment of cows with mastitis. The International Dairy Federation recommended microbiological methods using *Bacillus stearothermophilus* to control these antimicrobials in milk. However, this bacterium has no appropriate detection limits for all beta-lactam, reason by which studies with other species *Geobacillus* to detect beta-lactams at levels below the MRLs should be developed. Therefore, the aim of this article was to evaluate and to compare the detection limits of beta-lactam using two bioassays containing *Geobacillus kaustophilus* and *Bacillus stearothermophilus*. Sixteen bioassays in microtiter plates containing spores *G. kaustophilus* ($1,6 \cdot 10^5$ esporas/ml) and sixteen bioassays with *G. stearothermophilus* ($2,0 \cdot 10^6$ esporas/ml) in agar medium were prepared. The culture medium consisted of Mueller Hinton Agar (38 g/l), glucose (10 g/l), Brilliant Black (200 mg/l) and Toluidine blue (10 mg/l). The detection limits of penicillin, amoxicillin, ampicillin, oxacillin, cloxacillin, cephalixin, cefoperazone, ceftiofur in milk were calculated. It is concluded that the bioassay with *G. kaustophilus* has higher detection limits compared with bioassay using *G. stearothermophilus*. Other thermophilic and sporulated bacteria-test should be investigated to improve the detection limits.

Keywords: bioassay; *Geobacillus kaustophilus*; *Bacillus stearothermophilus*; Microbiological test; milk.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento del ganado vacuno lechero con antibióticos (ATBs) betalactámicos durante el periodo de lactación constituye una práctica habitual para el control de mastitis (Diserens et al. 2005, Samanidou et al. 2009). Esta patología es muy frecuente y representa una de las principales causas en la aparición de residuos de betalactámicos en leche (Erskine et al. 2003, Dalton 2006, Kress et al. 2007).

La presencia de estas sustancias puede ocasionar serios inconvenientes para los consumidores, dentro de las



cuales se destacan sensibilización producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis de antibióticos, procesos alérgicos que en casos extremos pueden producir anafilaxia, perturbaciones pasajeras en la flora intestinal, reacciones de intoxicación frente a determinadas moléculas de antibióticos (Wilke et al. 2005, Demoly y Romano 2005, Khaskheli, 2008). También, la industria puede verse perjudicada debido a que las bacterias lácticas utilizadas en la fabricación de productos fermentados son afectadas por los residuos de antibióticos provocando retrasos en la acidificación, dificultad del cuajado y la maduración de los quesos (Packham et al. 2001, Berruga et al. 2007, Nawas et al. 2011).

A fin de evitar estos inconvenientes, diferentes legislaciones, tales como el Codex Alimentarius (2010), la Directiva de la Unión Europea (Commission Regulation 2010) y el Código Alimentario Argentino (CAA 2014) han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs) a fin de garantizar la inocuidad de la leche. Para el control rutinario de residuos de medicamentos en alimentos se utilizan comúnmente métodos de inhibición microbiológica, ya que permiten el análisis de un elevado número de muestras en un tiempo relativamente corto y a bajo costo (Toldra y Reid 2006, IDF 2010). La Federación Internacional de Lechería (IDF 2010) recomienda métodos microbiológicos que utilicen *Geobacillus stearothermophilus* para el control de antibióticos. Sin embargo, este microorganismo no presenta adecuados límites de detección (LD) para todos los betalactámicos empleados en la terapéutica ganadera, por lo que se plantea la necesidad de llevar a cabo estudios de límites de detección de otras especies de *Geobacillus* a fin de detectar betalactámicos a niveles inferiores a los LMRs. Por este motivo, el presente trabajo presenta como objetivo evaluar y comparar los límites de detección de dos bioensayos elaborados con *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus* como bacteria test para la detección de residuos de betalactámicos en leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de los bioensayos

Se utilizó un medio de cultivo constituido por Agar Mueller Hinton (38 g/l, pH=7,0±0,1; Biokar, Francia, Ref. 10272) glucosa (10 g/l, Anhedra®, Argentina, ref. 6837), mezcla de indicadores redox (200 mg/l Negro Brillante, Sigma Aldrich®, Ref. 211842; 10 mg/l Azul de toluidina, Anhedra®, Argentina, Ref. 6356). Posteriormente, se dividió en dos alícuotas que fueron inoculadas independientemente con 2,0 10⁶ esporas/ml de *Geobacillus stearothermophilus* C-953 y 1,6 10⁵ esporas/ml de *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263. Se dispensó un volumen de 100 µl/pocillo en placas de microtitulación utilizando un dispensador electrónico multicanal (Research® Pro, Eppendorf, Alemania). Los bioensayos fueron sellados con bandas aluminizadas de polipropileno y se conservaron refrigeradas a 4°C hasta el momento de uso. Se efectuaron un total de 16 bioensayos por cada bacteria-test (32 bioensayos en total).

Disoluciones de fármacos y muestras adicionadas de antibióticos

Se prepararon disoluciones en el momento de efectuar los análisis, que fueron utilizadas dentro de las dos horas posteriores a su elaboración, a fin de evitar cualquier desvanecimiento debido al tiempo o la acción de la luz. Para su preparación se pesó en una balanza analítica, 0.0100 g de cada sustancia (teniendo en cuenta la pureza informada por la casa fabricante), y se disolvió en un matraz de 10 ml utilizando el disolvente más adecuado para cada sustancia. De esta manera se obtuvieron las soluciones “stock” con una concentración de 1000 mg/l. A partir de esta se prepararon diluciones de cada antibiótico que correspondieron a concentraciones de 100, 10 y 1 mg/l.

Las muestras de leche adicionadas de ATBs se prepararon en matraces aforados de 10 ml. Para cada caso se tomó, con una micropipeta, la cantidad necesaria de las diluciones de antibiótico preparadas anteriormente (100, 10 y 1 mg/l, “stock”), siguiendo las recomendaciones de la IDF (IDF 2002) y el Codex Alimentarius (Codex 2010) que indican emplear un volumen de las soluciones de ATBs inferior al 1% del volumen de disolución final. Para la preparación de las disoluciones de leche se utilizó leche libre de antibióticos obtenida a partir de animales individuales, no tratados con medicamentos durante el experimento (IDF 2002).

Para el estudio de límites de detección de cada antimicrobiano se construyeron curvas dosis-respuestas para la cual se ensayaron 16 repeticiones de 12 concentraciones para cada uno de los 8 antibióticos betalactámicos (Sigma Aldrich): amoxicilina (A-8523), ampicilina (A-9518), cloxacilina (C-9393), oxacilina (O-1002), penicilina 'G' (PEN-Na), cefoperazona (C-4292), ceftiofur (32422) y cefalexina (C-4895). Las concentraciones de antimicrobianos se seleccionaron de modo tal de obtener dos resultados negativos en los niveles más bajos y dos resultados positivos en los niveles más altos (IDF 2002).

En cada pocillo de las placas, se depositaron 50 µl de las disoluciones de antibiótico preparadas previamente.



Luego, los bioensayos se incubaron en baño de agua flotante a 65°C (Dalvo, Santa Fe, Argentina) durante 3,5 h, período en el que se produce el cambio de color de las muestras control negativo (negro a amarillo) como consecuencia del crecimiento bacteriano.

A continuación, las microplacas fueron lavadas con agua bidestilada para retirar restos de muestras de leche y se realizaron lecturas fotométricas mediante un lector ELISA (Biotek ELx800TM; Biotek Instrument Inc., Winooski, USA) a 550 nm. A partir de los resultados obtenidos se calcularon las absorbancias relativas de acuerdo a la siguiente transformación:

$$A = (A_x - A_0) / (A_{100} - A_0) \quad (1)$$

Donde: A: Absorbancia relativa, A_x = absorbancia de las muestras de leche con una "x" concentración de antibiótico; A_0 : absorbancia de las muestras de leche libre de antibióticos (control negativo) y A_{100} : absorbancia de las muestras de leche que producen 100% resultados positivos.

Estas absorbancias relativas se analizaron en forma estadística mediante el modelo de regresión logístico del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (StatGraphics 2008):

$$L_{ij} = \text{Logit} [A_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [ATB]_i + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

Donde: L_{ij} = Modelo lineal Logístico; $[A_{ij}]$ = absorbancia relativa; $[ATB]_i$ = concentración de antibiótico ($i = 1, 2, \dots, 12$ niveles); β_0 and β_1 = coeficientes estimados y ε_{ij} = error residual.

Los límites de detección se calcularon como aquellas concentraciones de antibióticos que producen el 45% de absorbancias relativas (Althaus et al. 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las ecuaciones de regresión logística que modelan las curvas dosis-respuestas para los diferentes antibióticos betalactámicos se muestran en la **Tabla 1**. Los coeficientes de concordancia fueron elevados y estuvieron comprendidos entre 91,3% para penicilina (Bioensayo *G. kaustophilus*) y 99,3 para cloxacilina (Bioensayo *G. stearothermophilus*). El coeficiente "β₁" indica la pendiente de la curva dosis-respuesta para cada bacteria-test y la sensibilidad hacia los antibióticos. Los valores de los coeficientes "β₁" son más elevados para el bioensayo con *G. stearothermophilus* (β_{1,ceftiofur}: 0,0149 - β_{1,penicilina}:1,6088) en comparación con *G. kaustophilus* (β_{1,cefalexina}:0,0079- β_{1,penicilina}:0,4075), poniendo de manifiesto una mayor sensibilidad por parte de *G. stearothermophilus* en comparación *G. kaustophilus*.

Tabla 1. Ecuaciones de regresión logística que modelan las curvas dosis-respuesta de betalactámicos para bioensayos que utilizan dos bacterias test.

Betalactámicos	<i>G. stearothermophilus</i>		<i>G. kaustophilus</i>	
	Logit [A] = β ₀ + β ₁ [ATB]	C%	Logit [A] = β ₀ + β ₁ [ATB]	C%
Amoxicilina	L=-3,3171+0,4957[AMO]	91,6	L=-2,9755+0,2882[AMO]	95,9
Ampicilina	L=-1,6819+0,3231[AMPI]	92,4	L=-2,1433+0,2034[AMPI]	92,0
Cloxacilina	L=6,1341+0,1614[CLOXA]	99,3	L=-4,3379+0,1036[CLOXA]	99,2
Oxacilina	L=-2,8041+0,1441[OXA]	93,6	L=-3,9842+0,0929[OXA]	95,1
Penicilina "G"	L=-5,1136+1,6088[PEN]	96,4	L=-2,8053+0,4075[PEN]	91,3
Cefalexina	L=-3,6154+0,0285[CLX]	96,1	L=-2,7075+0,0079[CLX]	95,7
Cefoperazone	L=-4,5812+0,0527[CPZ]	93,5	L=-3,6636+0,0136[CPZ]	95,8
Ceftiofur®	L=-2,5882+0,0149[CFR]	93,6	L=-3,5239+0,0111[CFR]	94,3

ATB: Antibiótico, AMO: Amoxicilina, AMPI: Ampicilina, CLOXA: Cloxacilina, OXA: Oxacilina, PEN: Penicilina, CLX: Cefalexina, CPZ: Cefoperazone, CFR: Ceftiofur, C%: Coeficiente de concordancia.

La **Figura 1** representa las curvas dosis-respuesta de los ocho antibióticos betalactámicos analizados mediante bioensayos elaborados con *G. stearothermophilus* y *G. kaustophilus*. Se logra visualizar que las



curvas dosis-respuesta obtenidas para el bioensayo que contiene *G. stearothermophilus* poseen mayor pendiente (β_1) en comparación con bioensayo con *G. kaustophilus*, por lo cual, pequeños cambios en las concentraciones de antibióticos producen un aumento en las absorbancias relativas, denotando una mayor sensibilidad por parte de la bacteria test *G. stearothermophilus*.



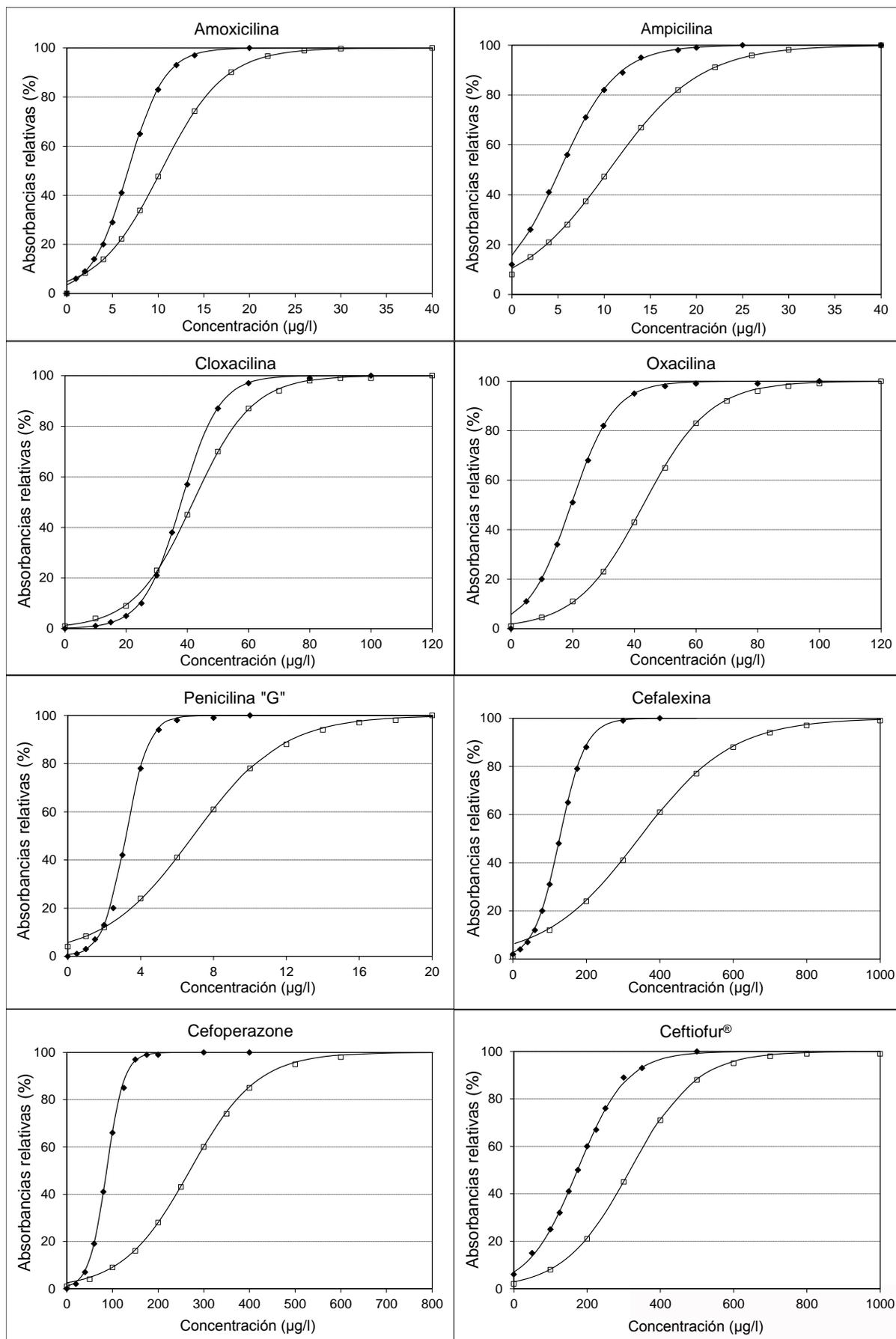
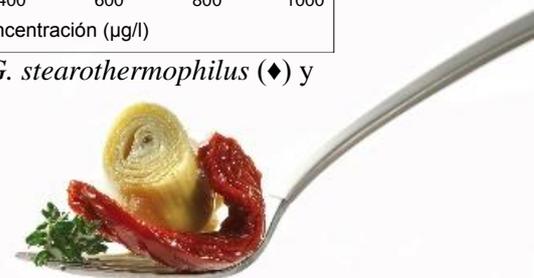


Fig. 1. Curvas dosis-respuesta de betalactámicos de un bioensayo con *G. stearotherophilus* (◆) y *G. kaustophilus* (□).



Los límites de detección (LD) de los bioensayos para los betalactámicos analizados se resumen en la **Tabla 2**. Se evidencia que bioensayo con *G. stearothermophilus* presenta LDs inferiores a los calculados para *G. kaustophilus* para amoxicilina (6 µg/l vs. 10 µg/l), ampicilina (5 µg/l vs. 10 µg/l), oxacilina (18 µg/l vs. 41 µg/l), penicilina G (3 µg/l vs. 6 µg/l), cefalexina (120 µg/l vs. 314 µg/l), cefoperazone (83 µg/l vs. 253 µg/l) y ceftiofur (160 µg/l vs. 299 µg/l). Residuos de cloxacilina (37-40 µg/l) en leche son detectados a concentraciones similares por ambos bioensayos. Por su parte, *G. stearothermophilus* presenta LDs cercanos a los Límites Máximos de Residuos de cada antibiótico. Por ello, se recomienda como método de screening para la detección de estas sustancias en leche.

Tabla 2. Límites de detección (µg/l) de betalactámicos para bioensayos con *G. stearothermophilus* y *G. kaustophilus*.

Betalactámico	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>G. kaustophilus</i>	LMR
Amoxicilina	6	10	4
Ampicilina	5	10	4
Cloxacilina	37	40	30
Oxacilina	18	41	30
Penicilina "G"	3	6	4
Cefalexina	120	314	100
Cefoperazone	83	253	50
Ceftiofur®	160	299	100

LMR: Límite Máximo de residuo (µg/l).

Los límites de detección obtenidos por Nouws et al. (1999) cuando utilizan *G. stearothermophilus* en placa de Petri (4 µg/l para amoxicilina y ampicilina, 30 µg/l para cloxacilina y oxacilina, 3 µg/l para penicilina, 80 µg/l para cefalexina y 55 µg/l para cefoperazone y ceftiofur) también fueron inferiores a los obtenidos en este trabajo, aunque requieren 18-24 horas de incubación.

Un estudio realizado por Gaudin et al. (2004) revela que la placa específica (*G. stearothermophilus*) para detectar betalactámicos en leche presenta límites de detección de amoxicilina (16 µg/l), cloxacilina (50 µg/l) y penicilina (16 µg/l) superiores a los reportados para los bioensayos con *G. stearothermophilus* y *G. kaustophilus*. Por el contrario, residuos de ampicilina (6 µg/l), oxacilina (30 µg/l), cefalexina (30 µg/l), cefoperazone (80 µg/l) y ceftiofur (125 µg/l) son detectados con mayor sensibilidad por parte del método microbiológico en placas de Petri que emplea entre 18 y 24 en obtener la respuesta.

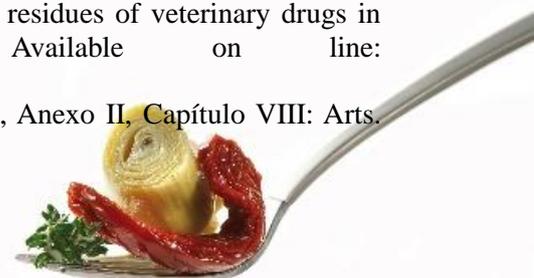
Los LDs obtenidos en este trabajo son similares a los 14 µg/l de amoxicilina, 8 µg/l de ampicilina, 49 µg/l de cloxacilina, 25 µg/l de oxacilina, 4 µg/l de penicilina, 190 µg/l de cefalexina, 140 µg/l de cefoperazone y 190 µg/l para ceftiofur, obtenidos por Nagel et al. (2013) cuando elaboran un bioensayo de respuesta dicotómica con esporas de *G. stearothermophilus*.

CONCLUSIÓN

A modo de síntesis se puede establecer que *G. stearothermophilus* presentó adecuados límites de detección para residuos de antibióticos betalactámicos en comparación con *G. kaustophilus*. No obstante, deberían estudiarse otras especies del género *Geobacillus* tales como *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, o *G. vulcani*, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

- Althaus RL, Torres A, Montero A, Balach S, Molina M.P. 2003. Photometric Measurements for detection of antimicrobials in ewe milk. *Journal of Dairy Science*, 86: 457–463.
- Berruga MI, Molina MP, Noves B, Roman M, Molina A. 2007. In Vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 62: 303-305.
- Codex Alimentarius. 2010. Codex committee on residues of veterinary drugs in foods. 19th session of the 30 August – 3 September 2010. Discussion paper on methods of analysis for residues of veterinary drugs in foods (CX/RVDF 10/19/6). Vermont, USA. Available on line: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCR/DF/ccrvdf19/rv19_06e.pdf.
- CAA (Código Alimentario Argentino). 2014. Ley 18.284, Decreto 2126/71, Anexo II, Capítulo VIII: Arts.



555, 556, 556 bis).

Commission Regulation. 2010. Council Directive n° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union, 15: 1–72.

Dalton J. 2006. Antibiotic residue prevention in milk and dairy beef. *Western Dairy News*, 6: 71-79.

Demoly P, Romano A. 2005. Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 1: 9-14.

Diserens J, Beck Henzelin A, Le Breton M, Savoy Perroud M. 2005. Antibiotics in milk: Actual situation & compilation of commercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk. Informe técnico: Quality & Safety Department, Nestlé Research Center. Lausanne, Switzerland. Pag 186.

Erskine R, Wagner S, De Graves F. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19: 109-138.

Gaudin V, Maris P, Fuselier J, Ribouchon N, Cadieu P, Rault A. 2004. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Additive and Contaminant*, 21: 422-433.

IDF (International Dairy Federation). 2002. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test". IDF-FIL, Bull N° 183. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

IDF (International Dairy Federation). 2010. Current situation & compilation of commercially available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk. IDF-FIL, Bull No 442. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Khaskheli M, Malik R, Arain M, Soomro A, Arain A. 2008. Detection of β -Lactam Antibiotic Residues in Market Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(5): 682-685.

Kress C, Seidler C, Kerp B, Schneider E, Usleber E. 2007. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Analytica Chimica Acta*, 586: 257-279.

Nagel O, Molina M, Althaus R. 2013. Microbiological system in microtitre plates for detection and classification of antibiotic residues in milk. *International Dairy Journal*, 32: 150-155.

Nawaz M, Wang J, Zhou A, Chaofeng MA, Xiaokang WU, Moore J, Millar BC, Jiru XU. 2011. Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Current Microbiology*, 62: 1081–1089.

Nouws J, Van Egmond H, Shulders I, Loeffen G, Schouten J, Stegeman H. 1999. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue level. *International Dairy Journal*, 9: 85-90.

Packham W, Broome M, Limsowtin G, Roginski H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56: 15-18.

Samanidou VF, Giannakis DE, Papadaki A J. 2009. Development and validation of an HPLC method for the determination of seven penicillin antibiotics in veterinary drugs and bovine blood plasma. *Journal of Separation Science*, 32: 1302–1311.

Statgraphics. 2008. Statgraphics Centurión XV® 2006 by StatPoint, Inc. Version 15.2.05 1. 1982-2007.

Toldra F, Reig M. 2006. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 482-489.

Wilke MS, Andrew L, Lovering AL, Strynadka NC. 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 525-533.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo con parte del proyecto CAI+D'11 (PI 501 201101 00575 LI, H.C.D. Resol. 205/13 Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) y PICT 2011-368 (Res. N° 140/12, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica).



Caracterización de films usados como de recubrimientos en zanahorias mínimamente procesadas

Vasco M.F. ⁽¹⁾⁽²⁾, Campañone L.A. ⁽¹⁾ Agnelli M.E. ⁽¹⁾⁽²⁾

(1) CIDCA (CONICET-CCT y UNLP) y MODIAL (FI- UNLP). 47 y 116 – (1900) La Plata, Bs As.

(2) UNMdP Fac. Cs. Agrarias, Balcarce. Argentina.

E-mail: agnelli.miriam@gmail.com

RESUMEN

Los films obtenidos a partir de las formulaciones a base de alginato de sodio (ALG), carboximetilcelulosa (CMC) y almidón de mandioca (MAN) fueron caracterizados a partir de sus propiedades de afinidad por el agua. Las suspensiones filmogénicas contienen, además, glicerol como agente plastificante, aceite de girasol para reducir la permeabilidad al vapor de agua y Tween 20 como agente surfactante. Se incluyó también la evaluación de films conteniendo sólo los hidrocoloides y glicerol para determinar el efecto de la adición de aceite (ASA, CSA y MSA). Se realizaron ensayos de solubilidad, hinchamiento, humedad y observaciones del aspecto visual. MAN fue el film menos soluble. ASA y CSA presentaron mayor hinchamiento que sus correspondientes con aceite, mientras que MAN y MSA no mostraron diferencias. CMC y MAN exhibieron menor humedad que sus controles poniendo en evidencia el efecto beneficioso del agregado de aceite para aumentar la barrera al vapor de agua. ALG mostró apariencia uniforme y opaca mientras que CMC fue brillante y heterogénea. MAN, por su parte, presentó un aspecto opaco y seco. Por ser MAN la película menos soluble y húmeda, podríamos inferir que un recubrimiento formado a partir de esta formulación sería el más efectivo para su aplicación en productos de alta humedad.

Palabras claves: Films, almidón, carboximetilcelulosa, alginato de sodio, recubrimientos comestibles.

ABSTRACT

Edible films prepared from formulations based on sodium alginate (ALG), carboxymethylcellulose (CMC) and cassava starch (MAN) were characterized regarding their water affinity properties. These suspensions also contained glycerol as plasticizer, sunflower oil to reduce water vapor permeability and Tween 20 as surfactant agent. Films containing only hydrocolloids and glycerol were also evaluated to determine oil addition effect (ASA, CSA and MSA). Analysis included solubility, swelling and moisture tests and visual appearance observations. MAN was the least soluble. ASA and CSA presented higher swelling than their corresponding oil containing ones while MAN and MSA showed no differences. CMC and MAN showed less moisture than their controls pointing out of the beneficial effect of oil addition to enhance water vapor barrier. ALG exhibited uniform appearance and opacity while CMC was shiny and heterogeneous. As for MAN, appearance presented as dry and opaque. MAN resulted in the least soluble and wet film. Thus we could infer that this coating formulation would be most effective to use on high humidity foodstuff.

Keywords: Films, cassava starch, carboxymethylcellulose, sodium alginate, edible coatings

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de hábitos de consumo de alimentos saludables y la menor disponibilidad de tiempo del hombre moderno a la hora de preparar sus alimentos han provocado un aumento en la demanda de vegetales y frutas listos para consumir (Olivas & Barbosa-Canovas, 2005). Los vegetales cortados son tejidos vivos y como tales soportan reacciones de deterioro que se traducen en cambios de color, textura, contaminación microbiana y la producción de compuestos volátiles indeseables reduciendo su vida de estantería. Los recubrimientos comestibles pueden ayudar a preservar los trozos de frutas y hortalizas recién cortados constituyendo una barrera para la humedad, el oxígeno y el dióxido de carbono (Viña et al. 2007, Tzoumaki et al. 2009). Son generados por aplicación de una disolución sobre un alimento que al secarse forma una película delgada que cubre su superficie y pueden ser consumidos como parte del producto (Pastor et al. 2007). De esta forma, se mejoran las propiedades mecánicas y texturales y se retardan otras reacciones en las que interviene el oxígeno (Han y Gennadios 2005, Zahedi et al. 2010). Los materiales usados para la formulación de recubrimientos generalmente son una mezcla de: proteínas, polisacáridos, plastificantes y



aditivos dispersados en diferentes tipos de solventes tales como agua o alcoholes. Los hidrocoloides son los biopolímeros más utilizados como recubrimientos y forman parte de la mayoría de las formulaciones que actualmente existen en el mercado, debido a que otorgan buenas propiedades mecánicas, barrera a los gases y adhesión, no aportan sabor ni olor y son además, materiales biodegradables. (Krochta y De-Mulder-Johnston, 1997). Entre los polisacáridos de uso más extendido se encuentran derivados de la celulosa, almidones y alginatos. Sin embargo, el problema es que la mayoría presenta alta permeabilidad al vapor de agua. Algunos estudios han propuesto cambios en la formulación del recubrimiento teniendo en cuenta principalmente las propiedades del alimento que se busca conservar. Entre ellos, se ha planteado la incorporación de compuestos lipídicos, tales como aceites vegetales, ácidos grasos y ceras naturales, con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua, junto con el agregado de agentes surfactantes como estabilizadores de la emulsión formada (Chiumarelli et al. 2012, Velickova et al., 2013, Fagundes et al., 2014). No obstante, se ha afirmado que el empleo de compuestos lipídicos afectan sus propiedades ópticas, mecánicas, de barrera a los gases y viscosidad (Rhim y Shellhammer, 2005).

Por otro lado, también ha sido estudiada la influencia del agregado de agentes plastificantes (sorbitol, glicerol, etc.) a las soluciones formadoras de film con el objeto de reducir las fuerzas intermoleculares entre los polímeros y aumentar su movilidad mejorando así la flexibilidad de la película. (Krochta y Sothornvit, 2001). El problema es que además afectan las propiedades de barrera al vapor del agua ya que tienen gran afinidad por la misma. Estos cambios dependen de la concentración del plastificante y de la humedad relativa ambiente.

La zanahoria es una de las hortalizas mínimamente procesadas más buscadas para su uso en sopas y ensaladas a pesar de su corta vida de estante. Ciertamente, el proceso de respiración provoca el desarrollo de un sabor amargo por la síntesis de productos fenólicos (Lafuente et al. 1989) y la apariencia blanquecina que presenta la superficie, producto de posibles reacciones de lignificación u oxidación de los carotenos. Se ha reportado que el uso de diferentes recubrimientos conduce al mantenimiento del color, el contenido de carotenos, la textura y la estabilidad microbiológica durante el almacenamiento de zanahorias cortadas (Jagannath et al. 2006).

La caracterización de algunas propiedades de los films secos contribuye a la comprensión de las propiedades de la formulación formadora de recubrimientos (FFR). En particular, la carga superficial y distribución de tamaño de las partículas afectará grandemente al sistema durante el proceso de secado del film, factores a los que el fenómeno de desestabilización de la emulsión está ampliamente ligado (Morillon et al., 2002). Las propiedades del film más relevantes para definir su uso potencial para una aplicación específica son las de barrera a los gases, mecánicas y ópticas (Sánchez-González et al., 2009). En este trabajo nos proponemos caracterizar los films obtenidos a partir de distintas suspensiones emulsionadas para recubrimientos comestibles y correlacionarlos con los resultados obtenidos al evaluar la evolución de la calidad durante el almacenamiento de rodajas de zanahoria recubiertas presentados en Vasco et al. (2016). Para ello se analizaron las propiedades de afinidad por el agua de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron almidón de mandioca (AM), carboximetilcelulosa (CMC), alginato de sodio (ALG) y aceite de girasol de grado alimenticio comercial. Se usó además cloruro de calcio anhidro (Anedra AG), glicerina (99,9%, Biopack) y Tween 20 (99,9 % Biopack).

Preparación y obtención de las suspensiones para la elaboración de films

A. Suspensión de ALG: se obtuvo una suspensión al 2% (p/p) mediante el calentamiento de la misma a 85°C en un baño termostático hasta lograr su completa disolución.

B. Suspensión de CMC: se obtuvo una suspensión al 0,4%(p/p) mediante el calentamiento de la misma a 85°C en un baño termostático hasta lograr su completa disolución.

C. Suspensión de MAN: se preparó una suspensión acuosa al 3% (p/p). La dispersión obtenida fue gelatinizada por calentamiento la misma en un baño termostático a 90°C durante 20 minutos, manteniendo agitación constante.

Formación y estabilización de las emulsiones

A las suspensiones viscosas obtenidas en A, B y C se les adicionaron glicerol como plastificante, Tween 20 como agente surfactante y aceite de girasol como fase grasa en las proporciones indicadas en la **Tabla 1**. Con el fin de lograr emulsiones uniformemente dispersadas, las mezclas fueron homogeneizadas durante un



tiempo total de 5 minutos, en un Ultraturax T25, con velocidad de 24500 rpm. Posteriormente fueron sumergidas en baño de ultrasonido durante 10 minutos a fin de eliminar las burbujas de aire formadas durante la homogeneización. Finalmente, las emulsiones se dejaron reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Todas las formulaciones descriptas han sido previamente evaluadas como FFR en rodajas de zanahorias envasadas y refrigeradas, con el objetivo de evaluar la efectividad de dichas emulsiones como recubrimientos comestibles (Vasco et al. 2016).

Tabla 1. Contenido de glicerol, Tween 20 y aceite de girasol de las formulaciones expresadas como % p/p.

Formulación	Glicerol [%]	Tween 20 [%]	Aceite de girasol [%]
ALG	2	1,3	0,025
CMC	2	0,7	7
MAN	0,3	0,2	0,8

Elaboración de películas comestibles a partir de las FFR

Las películas se prepararon a partir de las emulsiones mencionadas más arriba mediante la técnica de moldeado en placa. Se colocaron 20 gr de la misma en capsulas de Petri de PVC de 9 cm y se secaron en estufa a 37°C hasta contenido de humedad constante. Las películas a base de alginato se sumergieron en solución de Cl_2Ca al 2% durante 2 min para permitir el entrecruzamiento y volvieron a secarse en las mismas condiciones. Los films obtenidos fueron mantenidos en desecador hasta su empleo. De la misma forma, con el fin de evaluar el efecto del agregado de aceite en las propiedades del recubrimiento, se elaboraron películas sin agregado de aceite ni surfactante. Estas últimas fueron tomadas como muestras control de las películas CMC, ALG y MAN y denominadas CSA, ASA y MSA, respectivamente.

Caracterización de las películas

Todas las películas obtenidas, se caracterizaron de acuerdo a sus propiedades físicas ligadas a su afinidad por el agua, a través de las siguientes propiedades:

Solubilidad en Agua: se determinó sobre muestras de 3x3cm, las que fueron pesadas y sumergidas en agua destilada. Las muestras se mantuvieron bajo agitación durante 1 hora a 20°C. Las piezas remanentes se secaron nuevamente a 105°C hasta alcanzar peso constante y se calculó el % de solubilidad (S) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$S (\%) = \frac{\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final}}{\text{Peso seco inicial}} \times 100$$

En forma similar se evaluó la solubilidad de las películas a 100°C.

Hinchamiento: las medidas se realizaron cortando muestras de 3x3 cm que luego fueron introducidas en un recipiente a humedad controlada (HR 75%). Se registró el peso de las películas en balanza analítica a intervalos de tiempos regulares y se graficó el hinchamiento expresado en (%) de las matrices en función del tiempo.

Contenido de Humedad: la pérdida de peso de las películas se determinó mediante método gravimétrico, midiendo el peso a tiempo inicial y luego de ser secadas en estufa a 105°C hasta peso constante. Las muestras se evaluaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron en (%) (g agua/100 g película).

Aspecto Visual: se realizó la inspección visual de los films obtenidos luego de haberlos acondicionado en el desecador durante una semana.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), utilizando el programa estadístico InfoStat, versión 2015. Se empleó el test de comparaciones de Duncan con una significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solubilidad

La solubilidad es una propiedad determinante para la posible aplicación de las películas. En algunos casos, se requiere que las mismas sean insolubles en agua para mejorar la integridad del producto y la resistencia a la humedad; en otros, la disolución de las películas antes del consumo del producto puede resultar útil, como en



el caso de la encapsulación de alimentos o aditivos, o si la película se pensó para ser consumida junto con el alimento o para que se solubilice durante su cocción (Miramont et al., 2012). Una película con alto porcentaje de solubilidad verá comprometida su estabilidad si se quiere aplicar en alimentos de alta humedad. Si una película es muy soluble y se aplica sobre alimentos con alto contenido de humedad, como frutas o vegetales, los compuestos hidrofílicos que lo componen pueden perderse en el proceso de transpiración natural.

Los resultados obtenidos de solubilidad a 20 y 100°C de las películas con y sin aceite, se muestran en la **Figura 1**. Las películas a base de carboximetilcelulosa (CMC y CSA), se disolvieron rápidamente casi por completo. Este comportamiento, se puede atribuir a la gran naturaleza hidrofílica del hidrocoloide. Las películas a base de alginato (ALG y ASA) mostraron alta solubilidad aunque más moderada, también atribuibles a la naturaleza hidrofílica del componente principal. Por su parte, las películas a base de almidón (MAN y MSA), revelaron solubilidades similares entre sí y a su vez resultaron las menos solubles. Esto se debe probablemente a que este tipo de almidón posee un alto contenido de amilosa, cuyas cadenas se ordenan linealmente, tendiendo a agruparse con polímeros adyacentes a través de uniones puentes de hidrógeno, reduciendo su afinidad por el agua (Wurzburg, 1986). Por otro lado, la concentración de plastificante (de carácter hidrofílico) añadido a esta formulación, fue menor que la que se incorporó en las otras suspensiones. Los plastificantes reducen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas de polímero incrementando el volumen libre, en consecuencia, existe más espacio para que las moléculas de agua migren. Además los plastificantes hidrofílicos son compatibles con el material polimérico que forma la película y aumentan la capacidad de sorción de moléculas polares tales como el agua. Por su parte, la temperatura, no resultó ser una variable con impacto significativo sobre la solubilidad de los films estudiados.

La alta solubilidad de los films a base de carboximetilcelulosa con aceite se correlaciona con los resultados de Vasco et al. (2016) en el que se aplicaron estas formulaciones sobre la superficie de rodajas de zanahoria. Las rodajas con este recubrimiento mostraron altos valores de pérdida de peso y baja adherencia al vegetal.

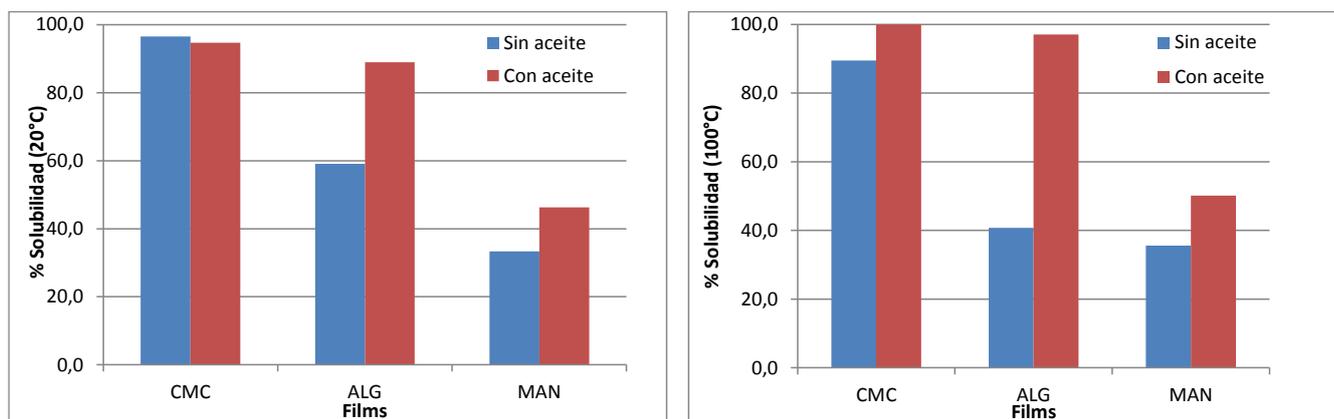


Figura 1. Solubilidad en agua a 20 y 100°C de películas de CMA, ALG y MAN, con y sin aceite

Capacidad de Hinchamiento

La **Figura 2** muestra el porcentaje de hinchamiento de las películas con y sin aceite en función del tiempo. Los resultados evidencian que los films CSA presentaron el mayor valor de hinchamiento. A su vez, se verifica que su valor crece en forma constante durante el tiempo del ensayo. Este comportamiento es otra prueba de la gran naturaleza hidrofílica como ya se infirió a partir de los altos valores de solubilidad (**Figura 1**). Por otra parte, el menor grado de hinchamiento del film de ASA podría explicarse por la menor capacidad de interacción que tienen las moléculas del hidrocoloide con las de agua del medio como resultado de la combinación de sus grupos carboxilos con los iones Ca^{+2} para provocar el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. Huang et al. (2008) obtuvieron resultados similares con films de gelatina dendronizados entrecruzados con genipín y Cerio (III) que resultaron menos hinchables en comparación con los de gelatina sin entrecruzar. Para el caso de los films CMC se observaron valores de hinchamiento más bajos que su respectivo sin aceite CSA. Esto puede explicarse por el alto porcentaje de aceite en su formulación. Morillon, et al. (2002) reportaron que la presencia de agentes hidrofóbicos en las películas comestibles es un factor esencial para limitar el nivel de hinchamiento y modificar todas las propiedades ligadas a la afinidad por el agua. Por el contrario, el film ALG mostró una evidente disminución del hinchamiento con el tiempo de



exposición a una atmósfera con HR 75%. Los films a base de alginato expuestos al medio ambiente tienden a contraerse por efecto de la sinéresis. Por este motivo, Sanchez-González (2009) advierte sobre la necesidad de conservar estos films en un medio muy húmedo. No obstante, los valores de solubilidad fueron elevados (**Figura 1**). La presencia en exceso del surfactante en el medio, de comportamiento hidrofílico (Tween 20), podrían explicar este resultado. La concentración empleada fue incluso muchas veces mayor que la de la matriz hidrofóbica utilizada (relación 1,3:0,025). Esta probable desproporción, pudo haber interferido en el entrecruzamiento del alginato con el calcio generando un enlace más débil incapaz de retener el agua a tiempos más largos. Cacicedo (2011), utilizando alginato de calcio como matriz de encapsulación para la liberación controlada de un antibiótico, informó sobre la tendencia de reducción de los porcentajes de encapsulación a medida que la concentración de antibiótico (de naturaleza hidrofílica) aumentaba y concluyó que altas concentraciones del antibiótico interferían en el proceso de gelificación. Por su parte, Di Pierro et al. (2006), expresa que el grado de hinchamiento de los materiales poliméricos depende en gran medida de la cantidad y la naturaleza de las interacciones intermoleculares de la cadena.

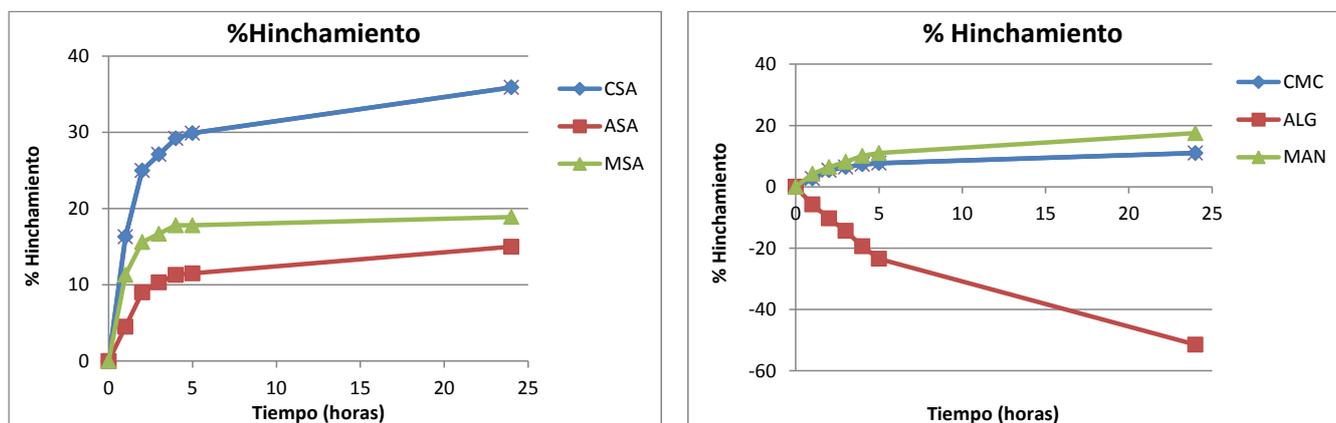


Figura 2. Porcentaje de Hinchamiento de películas de almidón de con aceite (MAN, ALG y CMC) y sin aceite (CSA, ASA y MSA).

Humedad

En la **Figura 3** se observa el porcentaje de humedad de los films formulados con y sin aceite. Como se puede observar entre los films sin aceite, el MAN presentó la mayor humedad. Su alta sensibilidad al vapor de agua y otras propiedades como su baja resistencia mecánica y la retrogradación del almidón con el tiempo son los inconvenientes que presenta este polímero y ya han sido registrados en varios estudios. (Jiménez et al. 2012; Ortega-Toro et al. 2014). Por otra parte, se puede observar que tanto en las películas de CMC como en las de MAN, la adición de aceite de girasol, disminuyó la humedad de las mismas tal como se esperaba de acuerdo a lo expresado sobre el efecto de incorporar un agente hidrofóbico a la formulación. La menor humedad del film de MAN, puede verificarse por el aspecto quebradizo y rígido del mismo (**Figura 4** y **Tabla 1**). Las películas de ALG, por el contrario, mostraron mayor humedad que su respectivo sin aceite (ASA). Esto podría atribuirse al exceso de emulgente de naturaleza hidrofílica presente en el medio y el escaso porcentaje de aceite añadido a la formulación.

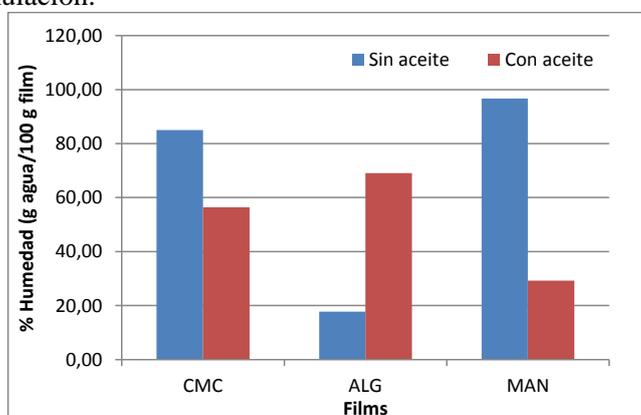


Figura 3. Porcentaje de Humedad de películas de CMC, ALG y MAN, con y sin aceite.



Aspecto Visual

En la **Figura 4** se muestran las fotografías de los films con y sin aceite. Los films de ALG mostraron una apariencia uniforme, compacta y opaca, sin presencia de burbujas interferentes. Resultaron films flexibles pero no débiles. Por su parte, los films de CMC aunque fueron transparentes y brillosos, no presentaron una buena apariencia, resultando películas muy débiles que se rompían con facilidad, de matriz heterogénea y con liberación de aceite en superficie. En el caso de los films de MAN, estos presentaron una matriz poco uniforme y continua, con aspecto opaco, rígido, seco y quebradizo (**Figura 4, Tabla 1**). Estas características se correlacionan con la baja humedad y solubilidad de los mismos (**Figuras 1 y 3**). Los films sin aceite se mostraron más uniformes, brillosos, flexibles y maleables. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Sánchez-González et al. (2009) quienes hallaron que el agregado de aceite en films a base de HPMC provoca una disminución en el brillo y un decaimiento en sus propiedades mecánicas (menor resistencia mecánica y menor deformación) dado que la fracción lipídica supone una debilidad en la estructura por la aparición de interrupciones en la red de polimérica.

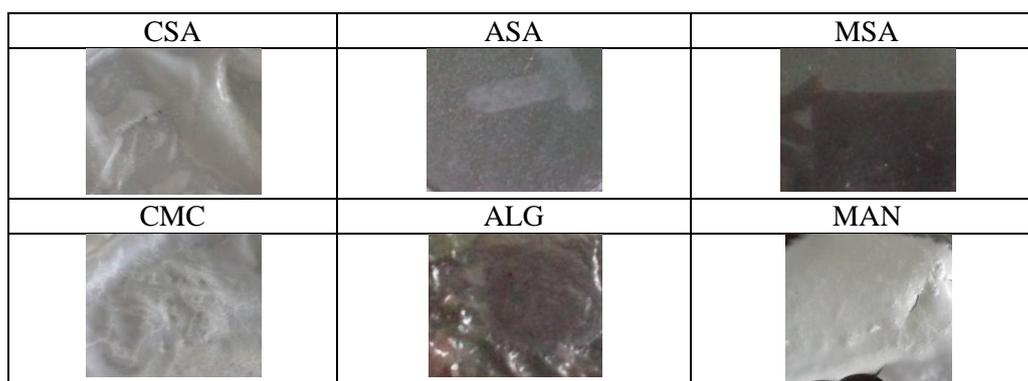


Figura 4. Fotografías de los films de CMC, ALG, MAN, ASA, CSA y MSA (con y sin aceite)

Tabla 1. Evaluación visual de las características de los films de CMC, ALG, MAN, ASA, CSA y MSA (con y sin aceite) secados a 37°C.

FILM SECO	Sin aceite			Con aceite		
	ASA	CSA	MSA	ALG	CMC	MAN
Rigidez / Flexibilidad	Flexible.	Flexible. No débil	Rígido	Flexible	Muy flexible y débil	Muy rígido y quebradizo
Uniformidad	Si	No	Si	No	No	No
Liberación de aceite	-	-	-	No	Si	No
Color	Opaco	Transparente Muy Brilloso	Transparente	Blanquecino, opaco	Traslúcido, brillante	Blanco, opaco

CONCLUSIONES

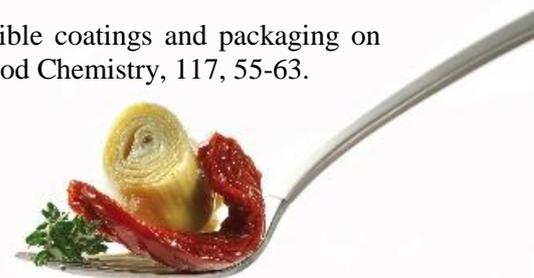
Los resultados mostraron que la incorporación de aceite provoca cambios significativos en las propiedades de los recubrimientos. La presencia de aceite en los films secos evidenció, en algunos casos, una mejora de las propiedades barrera de los films al disminuir el hinchamiento y la humedad pero no de sus propiedades mecánicas, que se vieron debilitadas (menor resistencia al quiebre y menos deformables) ni del brillo, que también se redujo. Teniendo en cuenta el aspecto visual de los films ninguno resultaría completamente efectivo como recubrimiento. Sin embargo, por ser MAN la película menos soluble y húmeda, podríamos concluir que un recubrimiento con esta solución sería el más efectivo para su aplicación en productos de alta humedad como la zanahoria dado que, de otra manera, los films podrían solubilizarse durante el proceso de transpiración natural del vegetal. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en Vasco et al. (2016) que



indicaron que las rodajas recubiertas con MAN presentaron características sensoriales similares a las del producto fresco y mayor retención de nutrientes que con ALG y CMC.

BIBLIOGRAFÍA

- Cacicedo M.L.; (2011). Encapsulación y liberación controlada de Enrofloxacin utilizando matrices biopoliméricas. (Trabajo de Tesis de grado). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Chiumarelli, M., Hubinger M. D. (2012). Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch - Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids* 28, 59-67.
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A., Masi, P., & Porta, R. (2006). Chitosan–Whey Protein Edible Films Produced in the Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. *Biomacromol.* 7(3), 744-749.
- Fagundes C., Palou L., Monteiro A. R., Pérez-Gago M. B. (2014). Effect of antifungal hydroxypropylmethylcellulose - beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold stored cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 92 (2014) 1–8
- Han, J. H., Gennadios, A. (2005). Edible films and coatings: a review. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* Amsterdam: Elsevier Science & Technology Books. 239-262.
- Huang, Y. Wei, T. Ge, Y. (2008). Preparation and characterization of novel Ce (III) -gelatin complex; *J. Of Applied Polymer Science.* 108 (6), 3804- 3807
- Jagannath, J. H., Nanjappa, C., Das Gupta, D., & Bawa, A. S. (2006). Studies on the stability of an edible film and its use for the preservation of carrot (*Daucus carota*). *International Journal of Food Science and Technology*, 41(5), 498–506.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P. And Chiralt. (2012). A Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302-310.
- Krochta, J.M., De-Mulder-Johnston, C., (1997) Edible and biodegradable challenges and opportunities. *Food Technology*, 51(2), 61-74.
- Krochta, J. M., & Sothornvit, R. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of b-lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149–155
- Lafuente, M. T., Cantwell, M., Yang, S. F., & Rubatzky, V. (1989). Isocoumarin content of carrots as influenced by ethylene concentration, storage temperature and stress conditions. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 258, 523–534
- Miramont, S. Gerschenson, L.N. Flores, S.K. (2012). Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos. (Tesis de Maestría). Ciudad Autónoma de Buenos Aires Recuperado de: <http://posgrado.frba.utn.edu.ar/investigacion/tesis/MTA-2012-Sofia%20Miramont.pdf>.
- Morillon et al., (2002) Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 67-89
- Olivas, G. I., y Barbosa-Canovas, G. V. (2005). Edible coatings for fresh cut fruits. *Critical Reviews in Food Science*, 45, 657–663.
- Ortega-Toro, R., Jiménez A., Talens, P., Chiralt A. (2014). Films de almidón termoplástico. Influencia de la incorporación de hidroxipropil-metil-celulosa y ácido cítrico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 134-141.
- Pastor, C.; Sánchez-González, L.; Marcilla, A.; Chiralt, A.; Cháfer, M.; González-Martínez, C. (2007). Water vapour permeability and optical properties of hydroxypropyl methylcellulose-oleic acid edible films. *Practical Applications of Research Results EFFoST/EHEDG Conference*.
- Rhim J. W., Shellhammer T. H. (2005). Lipid-based edible films and coatings, *Innovations in Food Packaging*. 21:362-383
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 20, 1–8.
- Tzoumaki, M. V., Biliaderis, C. G., Vasilakakis, M. (2009). Impact of edible coatings and packaging on quality of white asparagus (*Asparagus officinalis*, L.) during cold storage. *Food Chemistry*, 117, 55-63.



Vasco, M.F., Campañone, L.A., Agnelli, M.E. (2016). Uso de recubrimientos comestibles para limitar los cambios nutricionales y fisiológicos en zanahorias mínimamente procesadas. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de lo Alimentos, Córdoba.

Viña S. Z., Mugridge A., García M.A., Ferreyra R.M, Martino M. N., Chaves A.R., Zaritzky N. E. (2007). Effects of polyvinylchloride films and edible starch coatings on quality aspects of refrigerated Brussels sprouts. *Food Chemistry* 103, 701–709.

Velickova E., Winkelhausen E., Kuzmanova S., Alves V.D., Moldão-Martins M. (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* Camarosa) under commercial storage conditions. *LWT - Food Science and Technology* 52 (2), 80-92.

Zahedi, Y., Ghanbarzadeh, B., Sedaghat, N. (2010). Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 100, 102-108.

Wurzburg O. B, (1986). *Modified starches: Properties and uses* Edited by. Florida, British Polymer Journal. [21\(1\)](#), 87–88.



Uso de recubrimientos comestibles para limitar los cambios nutricionales y fisiológicos en zanahorias mínimamente procesadas

Vasco M.F.⁽¹⁾⁽²⁾, Campañone L.A.⁽¹⁾, Agnelli M.E.⁽¹⁾⁽²⁾

(1) CIDCA (CONICET-CCT y UNLP) y FI-UNLP. 47 y 116, 1900, La Plata, Bs As.

(2) UNMdP FCA, Balcarce. Argentina.

E-mail: agnelli.miriam@gmail.com

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la efectividad de distintos recubrimientos comestibles para retardar el deterioro de hortalizas mínimamente procesadas. Rodajas de zanahorias fueron sumergidas en soluciones formadoras de recubrimientos a base de: alginato de sodio (T1), carboximetilcelulosa (T2) y almidón de mandioca (T3). Las mismas contienen, además, glicerol como agente plastificante, aceite de girasol para reducir la permeabilidad al vapor de agua y Tween 20 como agente surfactante. Las rodajas recubiertas se envasaron y almacenaron a 4°C durante 15 días junto con muestras sin recubrir (control). Se evaluó la evolución en el tiempo de los siguientes parámetros: pérdida de peso (PP), aspecto visual, uniformidad del recubrimiento, actividad de la peroxidasa (POD) y contenidos de β -carotenos y fenoles totales. De los resultados se concluye que T1 y T2 no resultaron adecuados dado que las muestras perdieron aroma, nutrientes y presentaron alta actividad enzimática durante el almacenamiento. Por su parte, las muestras con T3 presentaron características similares al producto fresco, con buena apariencia visual, retención de nutrientes, buen control enzimático y baja PP. Se puede concluir que el uso de almidón de mandioca resultó ser eficiente, mejorando la calidad del producto final y prolongando la vida útil de zanahorias mínimamente procesadas.

Palabras claves: zanahoria, recubrimientos comestibles, almidón de mandioca, carboximetilcelulosa, alginato de sodio.

ABSTRACT

The effectiveness of several edible coatings was evaluated in order to reduce minimally processed vegetables deterioration. Sliced carrots were submerged in coating forming solutions based on sodium alginate (T1), carboxymethylcellulose (T2) and cassava starch (T3). Solutions also contain glycerol as plasticizer, sunflower oil to reduce water vapor permeability and Twen 20 as surfactant agent. Coated slices were packed and stored at 4°C for 15 days. Uncoated samples were also stored as control. Time evolution of weight loss (PP), visual appearance, coating uniformity, peroxidase activity (POD) and β -carotene and total phenol contents were assessed. T1 and T2 formulations resulted in poor coatings due flavor and nutrient losses together with a high enzymatic activity during storage. On the other hand, T3 coated samples showed similar characteristics to the fresh product with good visual appearance, nutrient retention, reduced enzymatic activity and low PP. It may be concluded that cassava starch formulation resulted in an efficient edible coating improving quality and shelf-life of the minimally processed carrots.

Keywords: Carrot, edible coatings, cassava starch, carboxymethylcellulose, sodium alginate

INTRODUCCIÓN

Los recubrimientos comestibles han demostrado ser de utilidad para la preservación de vegetales mínimamente procesados. Actúan como barrera para la pérdida de agua y el intercambio de gases provocando un efecto similar al del almacenamiento bajo atmósfera controlada o modificada, permitiendo mantener la firmeza, apariencia visual y sabor del producto. Los materiales empleados para su elaboración suelen ser una combinación de lípidos, polisacáridos, plastificantes, surfactantes y aditivos dispersados en diferentes tipos de solventes tales como agua o alcoholes (Vargas et al. 2008, Zahedi et al. 2010).

Los polisacáridos son capaces de formar una matriz polimérica continua biodegradable que presenta baja permeabilidad al O₂ y CO₂, reduciendo la velocidad de respiración de los productos mínimamente procesados. A su vez, refuerzan la acción de los agentes antipardeantes evitando que enzimas como las polifenoloxidasas entren en contacto con el O₂. Se logra así retardar el deterioro en frutas y vegetales



(Gonzalez-Aguilar et al. 2000). Diversos almidones e hidrocoloides han sido empleados con éxito originando recubrimientos que no imparten olor ni sabor al producto. Sin embargo, exhiben un fuerte carácter hidrofílico que los convierte en una barrera ineficiente para el vapor de agua. La adición de lípidos permite limitar la permeabilidad al vapor de agua pero pueden afectar la transparencia, las propiedades mecánicas y generar sabores desagradables (Rhim y Shellhammer 2005). Los lípidos más comúnmente usados son los ácidos esteáricos, palmítico y algunos aceites vegetales como soja o girasol. Estas mezclas de hidrocoloides y lípidos, necesitan la presencia de un agente surfactante para promover la formación de una emulsión. De la estabilidad de esta emulsión depende la microestructura del recubrimiento y sus características.

La incorporación de agentes plastificantes (sorbitol, glicerol, etc.) reduce las fuerzas intermoleculares entre los polímeros aumentando su movilidad y mejorando así la flexibilidad del film (Sothornvit y Krochta 2000). Pero, dada su naturaleza hidrofílica, también afectan las propiedades de barrera al vapor del agua. Estos cambios dependen de la concentración del plastificante y de la humedad relativa ambiente.

La zanahoria mínimamente procesada tiene una importante demanda pero su comercialización presenta algunos inconvenientes. El desarrollo de un sabor amargo por la síntesis de productos fenólicos (Lafuente et al. 1989) y el descoloramiento superficial por oxidación de los carotenos o reacciones de lignificación, hacen que su vida de estante sea corta. En este trabajo nos hemos propuesto determinar la efectividad del uso de distintos recubrimientos comestibles formulados a base de polisacáridos y aceite de girasol aplicados sobre rodajas de zanahoria para retardar su deterioro durante el almacenamiento refrigerado. Los polisacáridos seleccionados fueron carboximetilcelulosa (CMC), alginato de sodio (ALG) y almidón de mandioca (AM). La eficiencia de los mismos fue evaluada a través de la evolución de la calidad organoléptica y nutricional del vegetal durante el almacenamiento y la uniformidad de la película obtenida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron polisacáridos y aceite de girasol de grado alimenticio comercial (AM, CMC y ALG, Química Bolívar SRL. Mar del Plata, Argentina). Se usó además cloruro de calcio anhidro (Anedra AG), glicerina (99,9% Biopack) y Tween 20 (99,9 % Biopack).

Las zanahorias (*Daucus carota*) variedad “Chantenay” fueron adquiridas en el mercado local. Previo al cortado, fueron cepilladas bajo agua corriente y sumergidas en baño de agua clorada (200 ppm) durante una hora a fin de disminuir la carga microbiana inicial. Posteriormente fueron peladas, se descartó de 5 cm de la corona y se cortaron 6 rodajas de 1 cm de espesor. Del total obtenido, se tomaron al azar 9 rodajas que conformaron una muestra para cada recubrimiento y día de almacenamiento. Una vez registrado el peso, las muestras fueron descontaminadas por inmersión en agua clorada (50 ppm) durante 1 minuto, secadas con papel absorbente y sumergidas en la formulación formadora del recubrimiento.

Preparación y obtención de suspensiones

A. Suspensión de ALG: se obtuvo una suspensión al 2%, mediante el calentamiento de la misma a 85°C en un baño termostático hasta lograr su completa disolución.

B. Suspensión de CMC: se obtuvo una suspensión al 0,4%, mediante el calentamiento de la misma a 85°C en un baño termostático hasta lograr su completa disolución.

C. Suspensión de AM: Se preparó una suspensión al 3% p/p. La dispersión obtenida fue gelatinizada calentando en un baño termostático a 90°C durante 20 minutos, con agitación constante.

Formación y estabilización de las emulsiones

A las suspensiones viscosas obtenidas en A, B y C se les adicionaron glicerol como plastificante, Tween 20 como agente surfactante y aceite de girasol como fase grasa en las proporciones indicadas en la **Tabla 1** dando origen a las formulaciones T1, T2 y T3, respectivamente. Las mezclas fueron emulsionadas en Ultraturrax T25, con velocidad de 24500 rpm durante 5 minutos y luego sumergidas en baño de ultrasonido durante 10 minutos a fin de eliminar las burbujas de aire formadas durante la homogeneización. Finalmente, se dejaron reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las concentraciones empleadas en T1, T2 y T3 fueron seleccionadas a partir de ensayos previos.



Tabla 1. Contenido de glicerol, Tween 20 y aceite de girasol de las formulaciones expresadas como % p/p.

Formulación	Hidrocoloide	Glicerol [%]	Tween 20 [%]	Aceite de girasol [%]
T1	ALG (2%)	2	1,3	0,025
T2	CMC (0,4 %)	2	0,7	7
T3	AM (3%)	0,3	0,2	0,8

Aplicación del recubrimiento y almacenamiento de las muestras

La aplicación del recubrimiento se realizó por inmersión de las rodajas de zanahoria previamente pesadas en las formulaciones durante 2 minutos. Las rodajas introducidas en la formulación de alginato de sodio fueron posteriormente sumergidas en una solución de CaCl_2 (2%) durante 2 min para permitir el entrecruzamiento con Ca^{+2} . Una vez retiradas, se colocaron sobre una superficie enrejada y secadas en estufa con convección forzada a 25°C.

Posteriormente, las muestras fueron pesadas y envasadas en bolsas de polietileno de baja densidad, de 70 micrones de espesor, con permeabilidad intermedia al oxígeno, evitando posible deterioro oxidativo por exceso de oxígeno o fermentación por ausencia total del mismo.

El almacenamiento se llevó a cabo en cámara de refrigeración a 4°C durante 15 días. Rodajas sin recubrir, se trataron en forma similar sumergiéndolas en agua destilada (Control). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y cada determinación por duplicado. Se evaluó la calidad a diferentes tiempos de almacenamiento (0, 5, 10 y 15 días), a través de los siguientes parámetros.

Análisis de la Peroxidasa (POD): se realizó de acuerdo al método de Morales-Blancas et al. (2002), con modificaciones.

Extracción: Se pesaron en balanza analítica 2,5 gramos de las muestras trituradas y se agregaron 12,5 ml de buffer fosfato de potasio frío, (0,1 M pH: 6,5). La mezcla fue homogeneizada en Ultra Turrax-T-25 durante un minuto a 11000 RPM en baño de agua con hielo. Luego, fue filtrada a través de tela de liencillo. El filtrado se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes se filtraron con papel de filtro Whatman N° 1 y se mantuvieron en hielo hasta su análisis.

Actividad: La solución sustrato POD se preparó mezclando 0,1 ml de guayacol, 0,1 ml de peróxido de hidrógeno (30%) y 99,8 ml de buffer fosfato potásico y posterior homogenización. Los ensayos de actividad POD se llevaron a cabo mezclando 0,120 ml de extracto enzimático con 3,48 ml de solución sustrato. La actividad POD se midió a partir del aumento de la absorbancia a 470 nm en función del tiempo con un espectrofotómetro (UVPC 2401, Shimadzu Co.). La reacción se controló durante 3 min.

La actividad enzimática se determinó a partir de la pendiente máxima de la curva de absorbancia en función del tiempo calculada mediante regresión lineal y se expresó en U/ml de extracto.

Cuantificación de los Fenoles Totales (FT) se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu(FC) de acuerdo al método de Singleton et al. (1999) con modificaciones.

Extracción: se pesaron 2 gramos de la muestra procesada en balanza analítica, se agregaron de 6,25 ml de metanol 98%, se procedió a la homogenización en un Ultra Turrax-T-25 a 16000 rpm en baño de agua con hielo durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 5000 rpm. A continuación se tomaron 6 ml del extracto que fueron filtrados mediante cartuchos de C18 previamente acondicionados.

Cuantificación: se colocaron 200 µl del extracto fenólico, 200 µl de metanol, 200 µl reactivo FC y 1,4 ml de Na_2CO_3 en tubos de microcentrífuga de 2 ml. Se agitó brevemente y se las mantuvo en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente para que finalice la reacción. Luego, se procedió a centrifugar a 13000 rpm durante 3 minutos y determinar la absorbancia a 725 nm del sobrenadante. Los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de peso seco de la muestra.

Cuantificación de β -carotenos: se utilizó el método de Biswas et al. (2011), con modificaciones.

Extracción: se pesó 1 gramo de la muestra procesada sobre un tubo de centrífuga recubierto por papel aluminio en balanza analítica. Luego se añadieron 5 ml de acetona fría, y la mezcla se homogeneizó en Ultra Turrax T-25 (2 minutos, 11000 rpm) en baño de agua con hielo. Se dejó en reposo durante 5 min y luego se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue recogido y el sedimento sometido a segunda extracción con 5 ml de acetona, operando de la misma forma que en la primera extracción. La mezcla de ambos sobrenadantes fue filtrada con un filtro Whatman N°42.



Cuantificación: la absorbancia del extracto fue determinada a 449 nm en espectrofotómetro UV visible. Los resultados se expresaron como μg de β -caroteno por g de peso seco de la muestra.

Pérdida de Peso (PP): las rodajas fueron pesadas en balanza analítica, antes y después de hacer el recubrimiento y durante cada día de análisis, para determinar la pérdida de agua durante cada etapa.

Aspecto Visual: se hizo hincapié en el aspecto de las rodajas respecto de la muestra fresca, color, olor típico, exudado de líquido, firmeza ante el corte con cuchilla y uniformidad y adherencia del recubrimiento. Las observaciones fueron registraron empleando los siguientes parámetros descriptivos:

Aspecto general: similar al fresco, presencia de lignificación/resequedad superficial

Color: naranja intenso, típico o pálido

Aroma: típico, no típico, pérdida

Textura: más o menos firme que el fresco

Exudado: bajo, medio o alto

Uniformidad: Referido a la acumulación de recubrimiento en sectores de la rodaja. Uniforme, no uniforme (con protuberancias del recubrimiento, principalmente en los extremos).

Adherencia: presencia de burbujas de aire o líquido entre la fruta y el recubrimiento, arrugas u otros síntomas que reflejen una separación entre la película y la superficie del vegetal. Se procedió a aplicar una leve fuerza tangencial para determinar la facilidad con que se lograba separar el recubrimiento de la rodaja. La clasificación se realizó en base a la siguiente escala: *Alta* (se desprende parcialmente al aplicar una fuerza tangencial media sobre la superficie del trozo), *Media* (se desprende parcialmente al aplicar una pequeña fuerza tangencial sobre la superficie del trozo), *Baja* (se desprende fácilmente con solo tocar el trozo).

Además, las muestras fueron fotografiadas para registrar algunas de las características mencionadas.

Uniformidad del Recubrimiento: se realizó en las muestras con recubrimientos a base de almidón, mediante la técnica de tinción con solución de yodo. Se preparó una solución con 12 gr de yodo metálico y 24 gr de yoduro de potasio llevando a 1 litro con agua destilada. Se la dejó reposar 24 horas para lograr una correcta disolución del yodo metálico. La solución reacciona con almidón produciendo un color púrpura profundo. Para visualizar la uniformidad y espesor del recubrimiento, la solución de yodo fue colocada en una bandeja. Las muestras de zanahorias recubiertas fueron sumergidas en la solución durante 1 minuto. Luego se las dejó reposar entre 5 y 10 minutos hasta completar la reacción y se observó la tinción azul oscura.

Materia Seca

Se determinó por pesaje de la muestra hasta peso constante (48 horas) en estufa a 60 °C, expresado en porcentaje.

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) y el test de comparaciones de Duncan con una significancia de $P < 0.05$ utilizando el InfoStat 2015.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** muestra la actividad de la POD en función del tiempo de almacenamiento para los casos evaluados. Se observa que ningún recubrimiento inhibe significativamente la actividad de la POD. T2 y T3 presentaron una tendencia similar a las muestras sin recubrimiento verificándose un aumento de la actividad en el quinto día de almacenamiento que se mantuvo sin cambios hasta el final. Además de las POD, otras enzimas presentes en los tejidos vegetales crudos son también responsables de su deterioro. Entre ellas encontramos las catalasas: polifenoloxidasas (PPO), lipoxigenasas (LOX), entre otras. Las LOX tienen una doble función en las verduras y frutas. Son responsables de la síntesis de diversos alcoholes y aldehídos característicos del aroma agradable de los productos frescos pero luego del procesamiento y durante el almacenamiento, causan cambios indeseables por oxidación o peroxidación de compuestos insaturados, generando compuestos de olores desagradables. Su acción provoca la destrucción de ácidos grasos indispensables y la formación de peróxidos que podrían actuar como sustratos de la POD (Charanjit 1999, Badui 2006). Este mecanismo podría explicar la alta actividad de POD observada en las muestras con T2 dado su alto contenido lipídico (7%). Sin embargo, las LOX no parecen actuar en la degradación del caroteno (**Figura 3**).

La muestra recubierta con almidón (T3), arrojó los niveles más bajos de actividad POD. Estos resultados concuerdan con Liu (2005) quien demostró que una de las características del almidón es permitir la obtención de films con baja permeabilidad al oxígeno. Por su parte, T1 exhibió un gran aumento de la



actividad POD en el décimo día de almacenamiento, superiores a la de las muestras control. Este hecho podría correlacionarse con la presencia del calcio en el recubrimiento y su interacción con la enzima presente en el tejido vegetal. Se sabe que, como parte de su estructura, las POD poseen dos iones Ca^{+2} que influyen en la actividad proteica y en su configuración estructural. En los tejidos vegetales, el calcio se encuentra como cofactor de varias enzimas. Hu et al. (1987) indicaron que un aumento de Ca^{+2} en el medio celular aumenta la actividad enzimática. También, Medda et al. (2003) observaron un efecto similar en la actividad de la POD de una planta herbácea, en respuesta tanto a la eliminación como a la adición de Ca^{+2} . Efectivamente, si éste se eliminaba, la actividad enzimática se reducía notablemente pero si se añadía al medio, la actividad se triplicaba. El efecto activador se debe a que en ocasiones estos cationes forman parte del sitio activo, se requieren para la interacción de la enzima con el sustrato o ayudan a mantener la conformación tridimensional, interactuando con alguna región de la enzima (Badui 2006).

La **Figura 2** presenta los resultados del contenido de fenoles totales. Inicialmente no se encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles de las muestras recubiertas y las frescas ($\alpha \leq 0,05$). Birt et al. (2001) han reportado que la concentración en polifenoles de cualquier alimento es muy variable porque depende de muchos factores tales como la variedad o el grado de maduración de los vegetales. En el caso de las muestras control se observó un aumento del contenido de fenoles durante el almacenamiento. Estos resultados concuerdan con lo esperado de acuerdo a lo reportado anteriormente por otros autores que indican que el contenido de compuestos fenólicos aumenta con el daño producido (Aubert et al. 1993, Reyes et al. 2007). Las muestras recubiertas también presentan un aumento del contenido de fenoles y su evolución es prácticamente la misma que la de las muestras control. Sólo la muestra con T1 presentó valores de fenoles mayores al final del almacenamiento, superando ampliamente a los contenidos hallados en las muestras control y con recubrimientos T2 y T3 (aproximadamente 100 y 70 mg/100 g PS, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Ayala et al. (2012) en su trabajo sobre la calidad de mora con un recubrimiento comestible a base de alginato de sodio entrecruzado con Ca^{+2} . La acumulación de fenoles en las muestras con y sin recubrimiento pudo haber sido promovida por la mayor actividad enzimática encontrada (**Figura 1**). De hecho, las diferencias observadas en el contenido de fenoles al final del almacenamiento son compatibles con la mayor actividad de POD en las muestras recubiertas con T1.

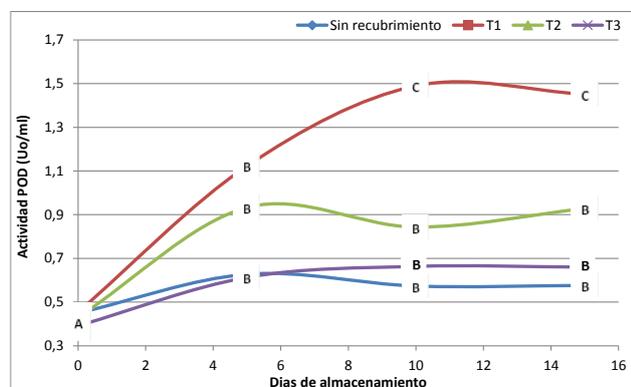


Figura 1. Actividad de la POD durante el almacenamiento en muestras control y recubiertas.

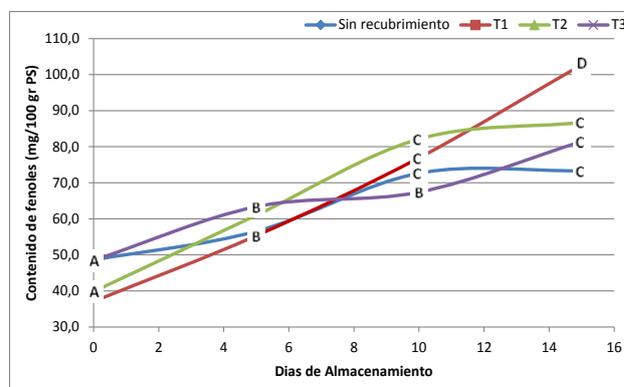


Figura 2. Contenido de fenoles totales durante el almacenamiento en muestras control y recubiertas.

La **Figura 3** presenta los resultados del contenido de β -carotenos. El contenido inicial de las muestras sin recubrimiento se mantuvo sin cambios a lo largo del almacenamiento. El mismo comportamiento se observa en las muestras recubiertas con T2 y T3. Por su parte, el contenido inicial de carotenos en las muestras recubiertas con T1 no varió hasta el día 5 pero pudo observarse una disminución significativa a partir del día 10 para luego mantenerse sin cambios hasta el final ($p \leq 0,01$). Según Gross (1991), la actividad de POD tiene un impacto en las pérdidas de carotenos por oxidación y lo hacen más rápido en los productos deshidratados. En base a esto, la disminución registrada con T1 puede asociarse a la alta actividad enzimática hallada para ese tiempo de almacenamiento que produce la destrucción de estos pigmentos (**Figura 1**).

La **Figura 4** revela que todas las muestras presentaron una PP progresiva con el tiempo de almacenamiento, sin embargo, la más marcada se registró en las rodajas sin recubrimiento. Estas últimas presentaron una disminución significativa de su peso como resultado del tratamiento de secado previo al envasado y continuó durante el almacenamiento, hecho observado además por el exudado presente sobre las rodajas (**Tabla 1**).



Por su parte, las rodajas recubiertas presentaron PP durante la etapa del secado previo al envasado, aunque menores que las muestras sin recubrir (aproximadamente 3 %), y hasta el quinto día de almacenamiento para luego mantenerse sin cambios hasta el final. La PP fue más acentuada con T2 (aproximadamente 5%), en comparación con T1 y T3 (aproximadamente 2%). Este resultado es, en principio, en apariencia contradictorio si se tiene en cuenta que T2 es el recubrimiento con mayor contenido de aceite. La menor PP hallada con T1 concuerdan con los resultados de Rojas-Graü et al. (2007) que registraron un aumento en la resistencia al vapor de agua al agregar 0,125% de aceite de girasol en recubrimientos de alginato de sodio (con 1,75% de glicerol) aplicados sobre manzana trozada. Por su parte, Hernandez et al. (2011), encontraron que los recubrimientos de mandioca sobre tomate resultaron ser más eficientes para disminuir la PP al agregar 2% de aceite de canela.

La **Tabla 1** exhibe los resultados de la observación visual realizada en las rodajas de zanahoria antes, después de aplicar el recubrimiento y durante el almacenamiento en cámara a 4°C. Se puede destacar que, con respecto al producto fresco, las muestras sin recubrir mostraron un aspecto reseco, lignificado, con exudado y ausencia de aroma y color característico que se fue acentuando con los días de almacenamiento (**Figura 5**). Por su parte, las muestras T1 y T2 mostraron un color naranja intenso, con aroma típico que se mantuvo por pocos días. Esto puede deberse a su baja efectividad para controlar la actividad enzimática. Además, se observó una rápida disminución en la firmeza con exudado de líquido en la superficie que fue más marcada con T2 y se correlaciona con su pérdida de peso (Figura 4). El recubrimiento T2 también es muy heterogéneo y presenta baja adherencia a la rodaja. Esto explica la PP registrada a pesar de la alta concentración de aceite de esta formulación. La decoloración observada tanto en el producto sin recubrir como con T2 durante el almacenamiento no puede adjudicarse a cambios en el contenido de carotenoides, aunque no se descarta su oxidación a nivel superficial. El cambio en la intensidad del color naranja corresponde fundamentalmente a cambios asociados a la formación de lignina. En el caso de T1, la uniformidad y adherencia del recubrimiento fueron óptimas, motivo por el cual el aspecto y color característico se mantuvieron sin cambios por más tiempo durante el almacenamiento (**Tabla 1**). Las muestras con T3, por su parte, presentaron una apariencia óptima, similar al producto fresco en cuanto a color, firmeza, aspecto general y aroma (**Tabla 1** y **Figura 5**).

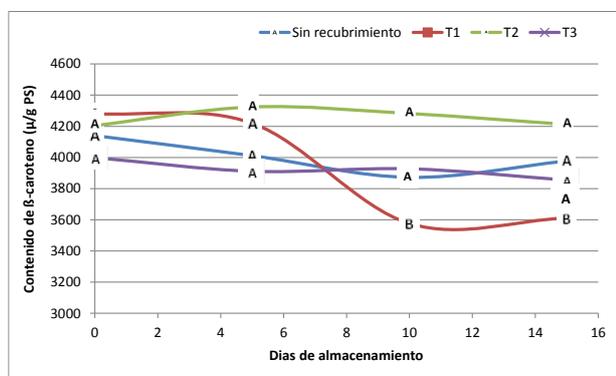


Figura 3. Efecto de la retención de β carotenos con el almacenamiento de muestras con y sin recubrimiento.

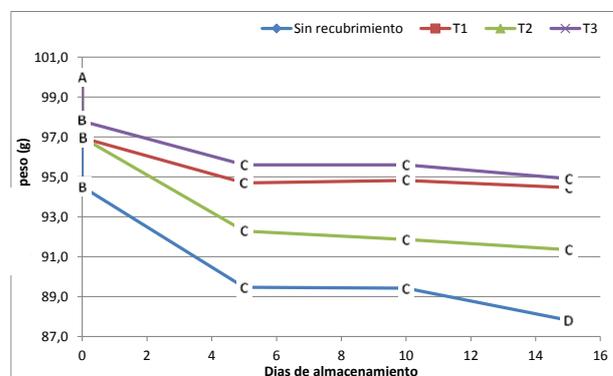


Figura 4. Evolución del peso en función del tiempo para muestras con y sin recubrimiento.



La **Figura 6** presenta las muestras de zanahorias después de ser sometidas a tinción por yodo. Esta técnica, permite ver el espesor y uniformidad de los recubrimientos de almidón (T3). El test del I₂ evidenció un recubrimiento no uniforme, con zonas de tinción más pálidas que otras. Esto se condice con la observación visual de la uniformidad del recubrimiento realizada durante el almacenamiento de las muestras (**Tabla 1**). Erbil y Muftugil (1986), establecieron que la permeabilidad de un film hidrofílico puede estar afectada, entre otros factores, por la morfología de la matriz polimérica, es decir, el espesor y la homogeneidad. Esto explicaría los resultados negativos encontrados para este recubrimiento, como la PP o aumento de la actividad POD.

CONCLUSIONES

El recubrimiento de alginato de sodio (T1) es uniforme y homogéneo y con buenas propiedades de barrera al vapor de agua, sin embargo, las muestras presentaron pérdida de aroma, nutrientes y alta actividad enzimática durante el almacenamiento. El recubrimiento de CMC (T2), a pesar de permitir la retención de nutrientes, tampoco resultó efectivo por presentar una deficiente barrera al vapor de agua, con alto exudado de líquido, color y aroma, acompañado de una alta actividad de la POD. Por su parte, las muestras recubiertas a base de almidón de mandioca (T3), presentaron características similares al producto fresco, con buena apariencia visual y retención de nutrientes, probablemente debido a un control enzimático eficiente. De esta forma, puede concluirse que el uso de almidón de mandioca bajo las condiciones de aplicación empleadas, mejora la calidad del producto final y prolonga la vida de estantería de los vegetales mínimamente procesados.

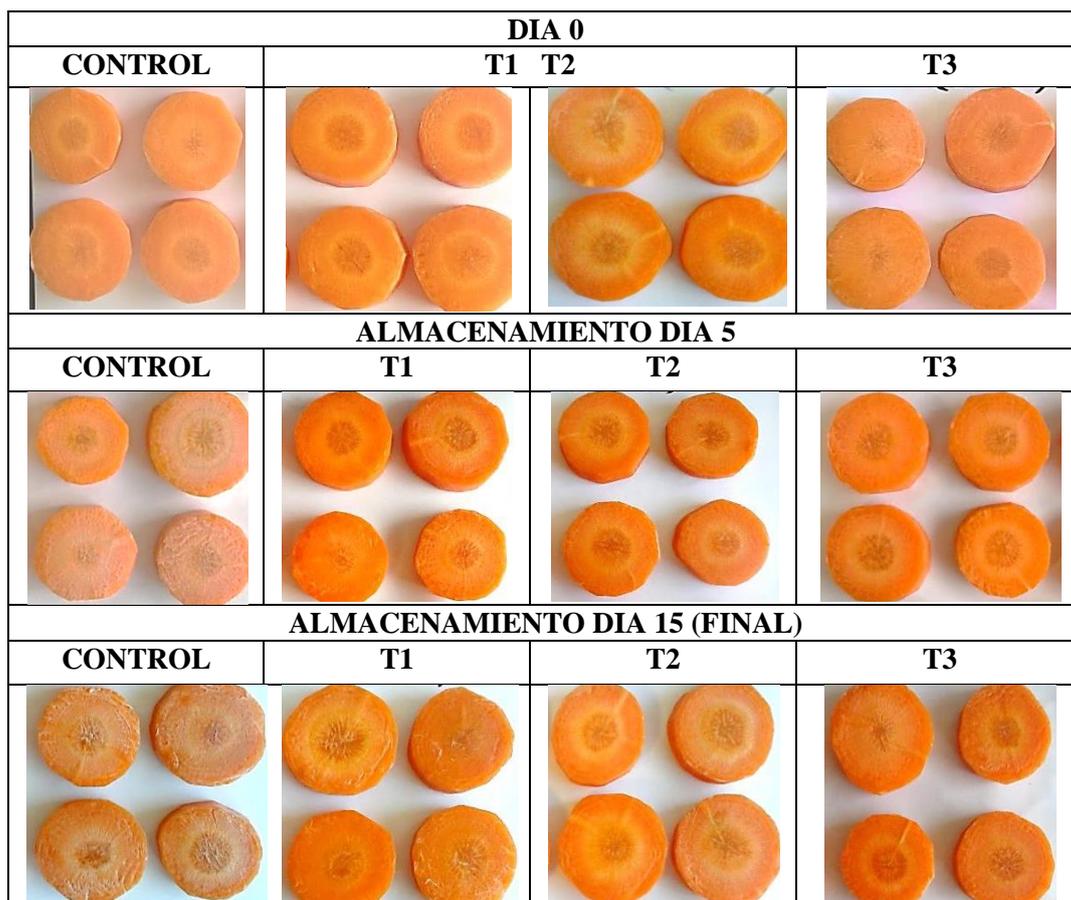


Figura 5. Apariencia visual de las rodajas de zanahoria. Muestras control y recubiertas a los días 0, 5 y 15 días





Figura 6. Uniformidad del recubrimiento de almidón (T3) en rodajas de zanahoria sometidas a tinción por iodo al final del almacenamiento (día 15).

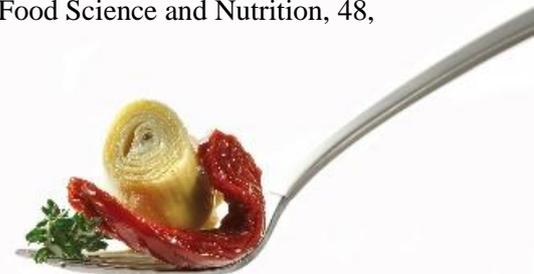
Tabla 1. Evaluación subjetiva de la calidad en las zanahorias con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 4°C.

	Aspecto evaluados	Sin tratar (control)	T1	T2	T3
0	Aspecto general	Típico, fresco	Superficie Brillosa	Similar al fresco.	Muy similar al fresco.
	Color	típico	muy intenso	Intenso	Típico
	Aroma	Típico	Típico	Típico	Típico
	Textura	Firme	Firme	Firme	Firme
	Exudado	-	-	-	-
	Uniformidad (RC)		Uniforme	Uniforme	No uniforme
	Adherencia (RC)		Alta	Media	Media
5	Aspecto general	Lignificado y reseco	Superficie Brillosa	Recubrimiento en exterior de rodajas y envase	Algo reseco, comparado con T1 y T2
	Color	pálido	Intenso	Intenso	Típico
	Aroma	Típico	Típico	Típico	Típico
	Textura	Firme	Firme	Menos firme que T1.	Firme
	Exudado	Medio	Bajo	Medio	Bajo
	Uniformidad (RC)		Uniforme	Uniforme	No uniforme
	Adherencia (RC)		Alta	Baja	Media
10	Aspecto general	Lignificado, reseco, agrietado	Superficie Brillosa, algo reseca	Ídem día 5	Ídem día 5
	Color	pálido blanquecino	Ídem día 0	Pálido	Ídem día 5
	Aroma	pérdida	Pérdida	Pérdida	Ídem día 5
	Textura	Firme, tejido, algo contraído	Firme. Disminución en superficie	Ídem día 5.	Ídem día 5
	Exudado	Medio	Bajo	Medio	Bajo
	Uniformidad (RC)		Uniforme	No uniforme	No uniforme
	Adherencia (RC)		Alta	Baja	Media
15	Aspecto general	Muy lignificado y reseco, agrietado	Zonas resacas y lignificadas	Zonas resacas y lignificadas	Ídem día 5
	Color	blanquecino, muy pálido	menos intenso que días previos	Pálido	Intenso
	Aroma	pérdida	Ídem día 10	Ídem día 10	Pérdida
	Textura	Firme. Tejido contraído	Ídem día 10. Tejido no contraído	Ídem día 5. Tejido no contraído	Ídem día 5. Tejido no contraído
	Exudado	Alto	Bajo	Medio	Bajo
	Uniformidad (RC)		Uniforme	No uniforme	No uniforme
	Adherencia (RC)		Alta	Baja	Media



BIBLIOGRAFÍA

- Aubert, S.; Babic, I.; Amiot, M.; Nguyen-The, C. 1993. Les composés phénoliques marqueurs de la qualité de carottes conservées au froid. *Acta Horticulturae*, Leuven. 354(1):201-214.
- Ayala S., Leidy C.; Valenzuela R., Claudia P.; Bohorquez P., Yanneth. 2012. Efecto de un recubrimiento comestible a base de alginato de sodio y iones de calcio sobre la calidad de mora de castilla (*rubusglaucusbenth*). Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 19: S129-S131.
- Badui, S. D. 2006. Química de los alimentos. Área: Química. Cuarta edición. Pearson Educación, México. ISBN: 970-26-0670-5.
- Birt, D., Hendrich, S. Y Wang, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention. Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 90: 157-177.
- Biswas A. K.; Sahoo J.; M. K. Chatli M. K. 2011. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *Food Science and Technology* 44: 1809-1813.
- Charianjit, K.; Sushil, K.; Harrish, C.K. 1999. Heat Stability of Lipoxygenase and Peroxidase During Blanching of vegetables. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 58: 1005-1009.
- Erbil, H.Y. and N. Muftugil. 1986. Lengthening the postharvest life of peaches by coating with hydrophobic emulsions. *J. Food Proc. Preserv.* 10:269-279
- González-Aguilar G A, Wang C, Buta, J G. 2000. Maintaining quality of fresh-cut mangoes using antibrowning agents and modified atmosphere packaging. *J. Agric. Food Chem.* 48:4204-4208.
- Gross, J. 1991. *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and carotenoids* AVI Books, Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hernández Barco, P. L., Burbano Delgado, A. C., Mosquera Sánchez, S. A., Villada Castillo, H. S., Porras, D. P. 2011. Efecto del recubrimiento a base de almidón de yuca modificado sobre la maduración del tomate. *Revista lasallista de investigación*. 8(2) 96- 103.
- Hu, C., Lee, D., Chibbar, R.N., van Huystee, R.B. 1987. Ca^{2+} and peroxidase derived from cultured peanut cells. *Physiol. Plant* 70: 99-102.
- Lafuente, MT, Cantwell, M, Yang, F, Rubatzky, V. 1989. Isocoumarin content of carrots as influenced by ethylene concentration, storage temperature and stress conditions. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 258, 523-534
- Liu, Z. 2005. Edible films and coatings from starch. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging*. London (England): Elsevier Academic Press. 318-332.
- Medda, R., Padiglia, A., Longu, S., Bellelli, A., Arcovito, A., Cavallo, S., Pedersen, J.Z., Floris, G. 2003. Critical role of Ca^{2+} ions in the reaction mechanism of *Euphorbia characias* peroxidase. *Biochemistry* 42(29), 8909-8918.
- Mei, Y. Zhao, Y. Yang, J., Furr, H. 2002. Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *Sensory and Nutritive Qualities of Food*, 67(5), 1964-1968.
- Morales-Blancas, E. F.; Chandia, V. E.; Cisneros-Zeballos, L. 2002. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from Broccoli, Green Asparagus and Carrots. *Journal of Food Science*, 67(1), 146-154.
- Reyes, L. F.; Villarreal, J. E.; Cisneros-Zeballos, L. 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*, London, 101(3), 1254-1262.
- Rhim J. W., Shellhammer T. H. 2005. Lipid-based edible films and coatings. *Innovations in Food Packaging*. 21:362-383.
- Rojas-Graü M, Tapia M, Rodríguez F, Carmona A, Martín-Belloso O. 2007. Alginate and gellan based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids* 21: 118-127.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants, Pt A Methods in Enzymology*, 299:152-178.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. 2000. Plasticizer effect on oxygen permeability of B-lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6298-6302.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 496-511.



Evaluación de las condiciones de almacenamiento de pimentón utilizando el color como parámetro de calidad

Wierna V.¹, Colodro V.¹, Davies L.E.¹, Nazareno M.A.², Bonini N.A.¹

1: INIQUI-CONICET, Salta, Argentina.

2: CITSE-UNSE, Sgo. de Estero, Argentina

bonini@exa.unsa.edu.ar

RESUMEN

Se estudiaron los efectos del tiempo, la temperatura y la presencia de semillas del fruto en la evolución del color sobre muestras secas y molidas de pimentón de las variedades “Encalilla Alargado” y “Yokavil”. Las muestras fueron almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente, 4°C y -18°C por hasta 24 meses. El seguimiento de la degradación del color se realizó por métodos espectrofotométricos, colorimetría tristímulo (CIE-L*a*b*) y HPLC. La temperatura de conservación fue el factor más importante para evitar los procesos de degradación de carotenoides. Se observó una dependencia entre la luminosidad L*, el contenido de carotenoides en las muestras, y el varietal del cual provienen. Se concluye que con el agregado de semillas de *Capsicum* durante la producción de pimentón se logra una mayor estabilidad del color sin el agregado de antioxidantes exógenos. Finalmente, mediante determinaciones espectrofotométricas se definió un índice de degradación (ID) de carotenoides en pimentón. Las medidas de ID junto con el valor ASTA permiten no sólo clasificar una muestra de pimentón comercial sino también evaluar si existieron condiciones de conservación inadecuadas.

Palabras claves: pimentón, calidad, preservación de color, colorimetría.

ABSTRACT

The loss of colour in paprika (*Capsicum annuum*) lends to decrease in its commercial value as a consequence of degradation of carotenoid pigments. The effects of time, temperature and presence of *Capsicum* seeds were studied over colour changes in dried milled samples of paprika from “Encalilla Alargado” and “Yokavil” cultivars. Samples were stored in the darkness at room temperature, 4°C and -18°C up to 24 months. The monitoring of colour degradation was carried out by spectrophotometric methods and tristimulus colorimetry (CIE-L*a*b*). The storage temperature was the most important factor to avoid the process of degradation in carotenoids. A dependence between brightness, L*, carotenoids content in the samples and the cultivar from which they come, was observed. It was concluded that the addition of *Capsicum* seeds during the production of paprika a greater stability of colour is achieved without the addition of exogenous antioxidants. Finally, by spectrophotometric measurements, a degradation index, DI, was defined for the mixture of carotenoids in paprika. The determination of DI along with ASTA value would enable not only classify a paprika sample, but also assess if there were inadequate preservation conditions.

Keywords: paprika, quality, colour preservation, colorimetry.

INTRODUCCIÓN

El color en el pimentón es el principal atributo de calidad que determina su valor comercial. El deterioro del color durante el procesamiento y almacenamiento se atribuye a la degradación de sus pigmentos carotenoides. Por ello es importante analizar su pérdida para lograr las mejores condiciones de conservación durante la vida comercial del producto. La etapa de conservación durante la comercialización es de vital importancia para preservar sus características hasta el momento del consumo.

Los carotenoides de *Capsicum*, por su color, se clasifican dentro de la fracción isocrómica roja (R) o de la amarilla (Y). Dentro de la fracción R se incluyen a la capsantina y la capsorrubina; mientras que dentro de la fracción Y se encuentran el β -caroteno, la β -criptoxantina, la luteína, la zeaxantina y la violaxantina (Wierna et al. 2013).

El color ASTA (método ASTA 20.1) es mundialmente empleado para la selección, el seguimiento de la maduración y la caracterización de los distintos cultivares. Al reflejar la cantidad total de carotenoides



presentes en pimentón. El método ASTA constituye una herramienta para el seguimiento de la influencia en el color de distintas condiciones de procesamiento (Pérez-Gálvez et al. 2004).

Hornero-Méndez et al. (2002) propusieron, además del color ASTA, el empleo de la relación entre las concentraciones de carotenoides rojos a amarillos (R/Y) para el monitoreo y el seguimiento de las distintas etapas de producción de pimentón. Se sabe que los pigmentos comprendidos dentro de la fracción Y son más inestables y susceptibles a la oxidación que los de la fracción R. La menor estabilidad de los pigmentos Y fue atribuida (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994) a que se encuentran esterificados por ácidos grasos insaturados. Es por ello que la caída en el contenido de pigmentos totales y el aumento de la relación R/Y con respecto al material de partida permitirían establecer si se produjo un procesamiento inadecuado durante el almacenamiento.

La degradación de los carotenoides en el pimentón puede evitarse o retardarse mediante el control de variables tales como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, la exposición a la luz, etc.; o bien con el agregado de antioxidantes. Se procura evitar la adición de antioxidantes debido a las restricciones existentes cuando el producto se comercializa bajo las regulaciones de denominación de origen (Pérez-Gálvez et al. 2009).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de algunas variables que influyen en la calidad, luego de su envasado, durante la conservación del producto en la etapa de comercialización. Se analizaron muestras secas y molidas de *Capsicum annuum* L. de variedades desarrolladas por el INTA bajo la denominación “Encalilla Alargado” (EA) y “Yokavil” (YOK). Durante la molienda se prepararon muestras molidas con y sin las semillas presentes en el fruto. Las muestras fueron almacenadas en la oscuridad a distintas temperaturas por un período de hasta 24 meses. Por su rapidez y simplicidad, se aplicaron métodos espectrofotométricos y de colorimetría triestímulo para el seguimiento de la variación del color, así como evaluación de los carotenoides presentes mediante HPLC; correlacionando los resultados obtenidos por ambas metodologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron muestras secas y molidas de las variedades EA y YOK, preparadas por personal del INTA-Encalilla, envasadas en bolsas tipo Ziplock® de polietileno (120 µm) idénticas a las que se emplean para el envasado del pimentón durante su comercialización.

A efectos de analizar la influencia que tiene el agregado de semilla en la conservación del color se envasaron muestras con y sin el agregado de sus semillas durante la molienda.

A los efectos del presente trabajo las muestras se identificaron de la siguiente manera:

EA-ss y EA-cs: muestras provenientes de la variedad EA, molidas sin semilla y con semilla, respectivamente.

YOK-ss: muestras proveniente de la variedad YOK molida sin semilla (preparada para su estudio comparativo)

Sobres de cada una de estas muestras se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente (RT), a 4°C en heladera (TH) y, en el caso de la muestra de EA-ss, una tercera porción se almacenó a -18°C en freezer (TF).

El estudio de degradación de color se llevó a cabo durante los primeros 8 meses y luego a los 24 meses. Las muestras fueron analizadas dentro de las 72 h de ser separadas para su análisis. Los análisis se realizaron por triplicado sobre bolsas individuales que se abrieron en cada caso, para los distintos tiempos de almacenamiento.

Análisis de color

Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis marca Beckman modelo DU-520 con rango espectral entre 200 y 900 nm. Además del color ASTA (Método ASTA 20.1 (1986)), se determinaron las concentraciones de carotenoides correspondientes a las fracciones isocrómicas R y amarilla Y.

Color extraíble en acetona (Método ASTA 20.1) y carotenoides totales (C)

El “color extraíble” en acetona se determinó por duplicado, a partir de la absorbancia a 460 nm de los extractos acetónicos de las muestras de pimentón mediante la expresión (I_f); donde I_f es el factor de corrección determinado a 465 nm utilizando como estándar de referencia el filtro No. 2030 del National Bureau of Standards. Los carotenoides totales, expresados en gramos equivalentes de capsantina (g eq



caps/kg m.s.) sobre base seca, se calcularon a partir del color ASTA mediante la expresión (2) propuesta por la técnica ISO 7541-1989.

$$\text{Color ASTA} = 16,4 \cdot I_f \cdot (A_m^{460\text{nm}} / \text{masa de muestra seca (g)})_{(1)}$$

donde: $I_f = (A^{465\text{nm}}(\text{filtro NBS}) / A^{465\text{nm}}(\text{filtro exp}))$

$$C (\text{g eq. -caps/kg m.s.}) = \text{Color ASTA} / 37_{(2)}$$

Concentración de carotenoides en las fracciones R e Y.

La concentración de carotenoides, presentes en cada fracción isocrómica, se calculó por duplicado mediante las expresiones (3) y (4) (Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera 2001) a partir de las absorbancias a 472 y 508 nm de los extractos acetónicos.

$$C(R)(\mu\text{g/ml}) = (2144 A_{508\text{nm}} - 403,3 A_{472\text{nm}}) / 270,9_{(3)}$$

$$C(Y)(\mu\text{g/ml}) = (1724,3 A_{472\text{nm}} - 2450,1 A_{508\text{nm}}) / 270,9_{(4)}$$

Determinaciones de los atributos triestímulo

Se utilizó un colorímetro de reflectancia ColorTec PCM - Cole Parmer con procesador de datos. Las calibraciones se realizaron con platos estándares de colores blanco y negro. Se utilizaron los parámetros de medición recomendados por la CIE (CIE, 2004); esto es: iluminante D65 (luz de día promedio) y observador estándar a 10°. Las muestras se dispusieron en placas de Petri sobre la fuente de luz. Se utilizó la escala CIE $L^*a^*b^*$ para reportar los datos. Los componentes de cromaticidad presentan valores que van desde $-a^*$ (verde) a $+a^*$ (rojo) y de $-b^*$ (azul) a $+b^*$ (amarillo). Por su parte la luminosidad, L^* toma valores desde $L=0$ (negro) hasta $L=100$ (blanco). Sobre cada muestra se realizaron tres réplicas.

Determinaciones Cromatográficas sobre extractos saponificados de carotenoides

Las determinaciones cromatográficas (HPLC) se realizaron en fase normal utilizando un cromatógrafo marca Könik Modelo KNK-500. Se utilizó una columna de SiO_2 (Zorbax RX-Sil de 25 cm x 4mm DI, 5 μm) y como solvente de desarrollo un gradiente de hexano:acetato de etilo/isopropanol. La detección se realizó a 480 nm con detector UV-Vis.

Se obtuvieron extractos saponificados de las muestras en base a lo establecido en la técnica de la AOAC 970.64 (2006). Las extracciones se realizaron por duplicado. La concentración de carotenoides se expresó por unidad de peso seco de muestra (g/kg m.s.)

Las curvas de calibración se prepararon a partir de patrones de carotenoides, ya sea de origen comercial o purificados a partir de fuentes naturales, siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez Amaya (1999). Se utilizó un patrón comercial de β -caroteno (Merck), mientras los carotenoides luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y violaxantina, se obtuvieron a partir de extractos de pétalos de virreina (*Tagetes erecta* L.), frutos de papaya (*Carica papaya* L.) y pimiento amarillo (*Capsicum annuum lycopersiciforme flavum*), respectivamente. La capsantina y la capsorrubina se obtuvieron de las propias muestras de *Capsicum*.

La concentración de las soluciones patrones se calculó a partir de los coeficientes de extinción reportados en bibliografía (Britton et al. 2004) en el solvente de trabajo y fue corregida por su pureza cromatográfica. Los patrones purificados fueron mantenidas en recipientes protegidos de la luz y a una temperatura de -18°C hasta el momento de trabajo.

Determinación de granulometría

Se realizó la determinación granulométrica de las muestras con un tamizador automático (Zonytest EJR 2000). Se utilizó un set de cinco (5) tamices de mallas ASTM 40, 50, 80, 120 y 200.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La distribución del tamaño de las partículas es un parámetro que afecta la sensación visual de color de una muestra sólida sobre todo en lo que se refiere al parámetro de luminosidad (L^*). Se determinó la granulometría de las muestras a efectos de analizar la posibilidad de comparar los resultados colorimétricos. Se observó (**Figura 1**) que las muestras sin semilla de EA y YOK presentan distribuciones de tamaño semejantes, resultando sus resultados colorimétricos comparables. Por su parte, el agregado de semillas durante la molienda (**figura 1-c**) condujo a que el porcentaje de partículas que pasan la malla 40 sufra una



disminución de 96,8% a 83,2%. Esto como consecuencia de la mayor resistencia de las semillas a ser trituradas durante la molienda final en el molino de piedras.

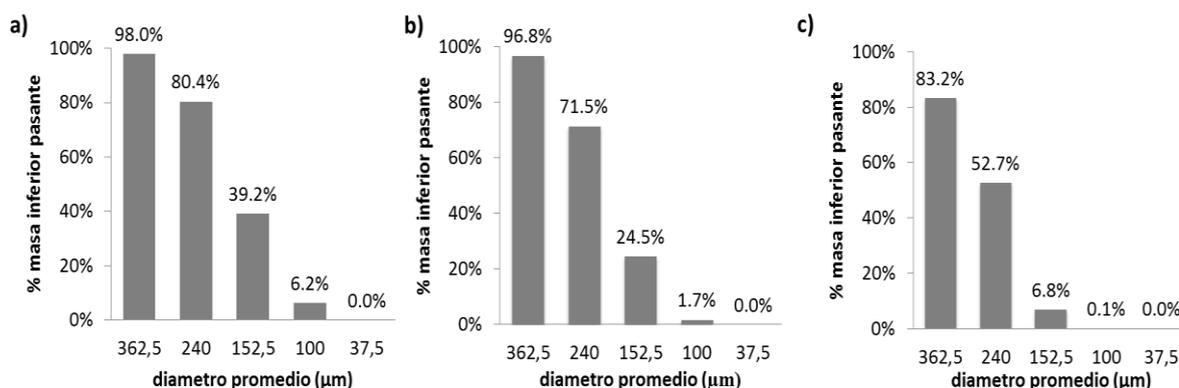


Figura 1. Distribución de tamaño de partículas de muestras de a) YOK-ss y b) EA-ss; c) EA-cs.

En la **Tabla 1** se muestra la concentración de carotenoides inicial (g-eq caps/kg) en las muestras de las diferentes variedades. En concordancia con los resultados anteriores (Wierna et al. 2013), las muestras de la variedad EA son más ricas en carotenoides, con una relación R/Y superior a la observada sobre la variedad YOK.

		(C) g-eq. caps/kg	R/Y	L*	a*	b*
EA	ss	7,7 ±0,02	1,08	42,7 ±0,8	28,5 ±1,3	31 ±4
	cs	5,8 ±0,07	1,03	42,0 ±0,4	30,6 ±0,2	37 ±1
YOK	ss	4,8 ±0,05	0,78	40,4 ±0,9	26,8 ±0,1	33 ±4

Tabla 1. Valores iniciales de concentración de carotenoides y atributos triestímulo de las muestras.

Para EA-cs se observó una disminución en un 25% (aprox.) en el contenido de carotenoides con respecto a EA-ss, debido al efecto de dilución que ejerce el agregado de semillas. En todos los casos los parámetros de cromaticidad a* y b* toman valores positivos, ubicando a las muestras dentro de la gama de los naranjas como consecuencia de la contribución de los pigmentos rojos (+a*) y amarillos (+b*). De los resultados (**Tabla 1**) se desprende que la presencia de las semillas, incrementa significativamente el valor positivo del parámetro b*. Esto puede explicarse por el efecto de extracción, por parte del aceite proveniente de las semillas, de los carotenoides apolares presentes en las partículas molidas de pimentón provocando una mayor exposición de los mismos. Estos carotenoides apolares se encuentran, prioritariamente, dentro de la fracción isocrómica Y.

Efecto de las condiciones de almacenamiento a distintas temperaturas

La degradación de los carotenoides presentes en las muestras de pimentón se ve retardada al disminuir la temperatura de almacenamiento, siendo éste el factor más influyente en la pérdida de color en muestras de pimentón (**figura 2 a-c**) (Wierna et al. 2014).

Las muestras EA-ss, conservadas a -18°C, presentaron una curva de degradación más lenta (**figura 2-a**). Así, en estas condiciones de almacenamiento, la pérdida de carotenoides fue de sólo el 12% al cabo de 8 meses, comparado con el 44% y 76% observado sobre las muestras conservadas a TH y RT, respectivamente. Por su parte, los carotenoides presentes en YOK-ss (**Figura 2-b**) sufrieron una degradación un 10% superior con respecto a los de EA-ss. Esto podría ser consecuencia de la mayor proporción de carotenoides de la fracción Y (menor relación R/Y) en esta variedad; siendo éstos más lábiles frente a la degradación oxidativa.



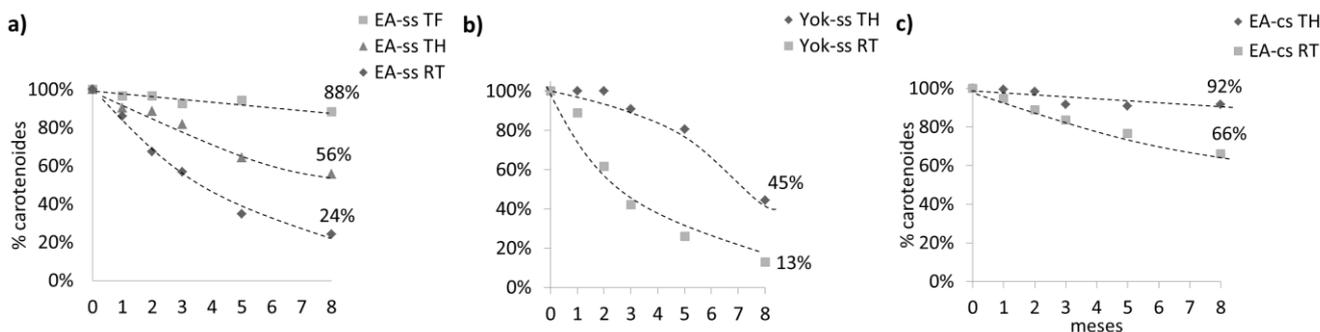


Figura 2. Variación del porcentaje de carotenoides en las distintas muestras durante el almacenamiento a distintas temperaturas (RT: temperatura ambiente; TH: 4 °C y TF: -18 °C).

En la **Figura 3** se muestra la variación, tanto en el contenido de los carotenoides de la fracción Y como los de la fracción R, para las muestras EA-ss y EA-cs conservadas hasta 24 meses a distintas temperaturas. En general, puede observarse que, junto con la degradación de los carotenoides totales, los valores de la relación R/Y tienden a incrementarse como consecuencia de la mayor degradación de los carotenoides amarillos. Esto último es más evidente en las muestras almacenadas a RT, evidenciándose, en estas condiciones, una aceleración del proceso degradativo.

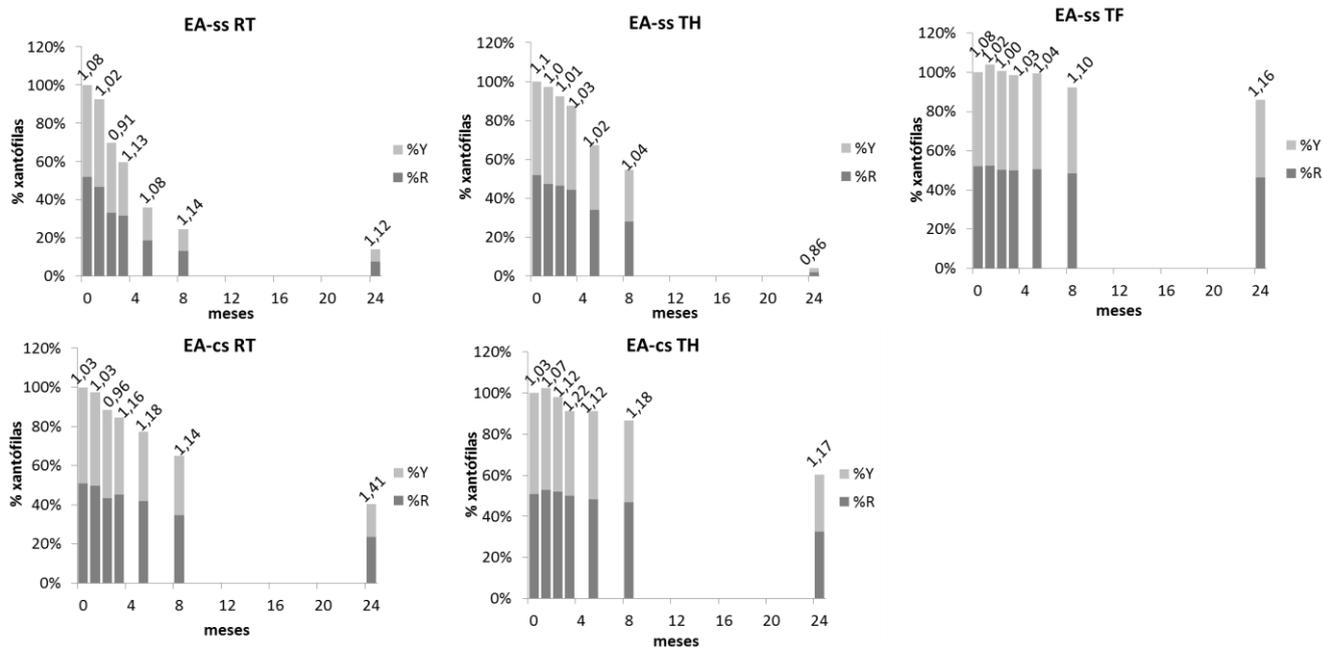


Figura 3. Porcentaje de carotenoides totales retenidos sobre muestras de las variedades EA-ss y EA-cs en función del tiempo de almacenamiento (meses). Sobre cada barra, que representa el porcentaje que se conserva de los carotenoides iniciales, se muestra la relación R/Y correspondiente.

Con la degradación de los carotenoides se observaron incrementos en los parámetros de color L* y b* sin verse afectados, en cambio, los valores de a* (**Figura 4-a y -b**). Los incrementos en L* durante el almacenamiento se justifican por el hecho de que las muestras se tornan más claras debido a las reacciones de degradación de los carotenoides presentes. Las temperaturas bajas de almacenamiento retardan la degradación y por lo tanto los valores de L* se mantienen próximos a los valores iniciales (**Figura 5**). Al mismo tiempo, se observa que, junto con la decoloración de las muestras, aumenta la sensación visual del color amarillo, aumentando el valor del parámetro b*.



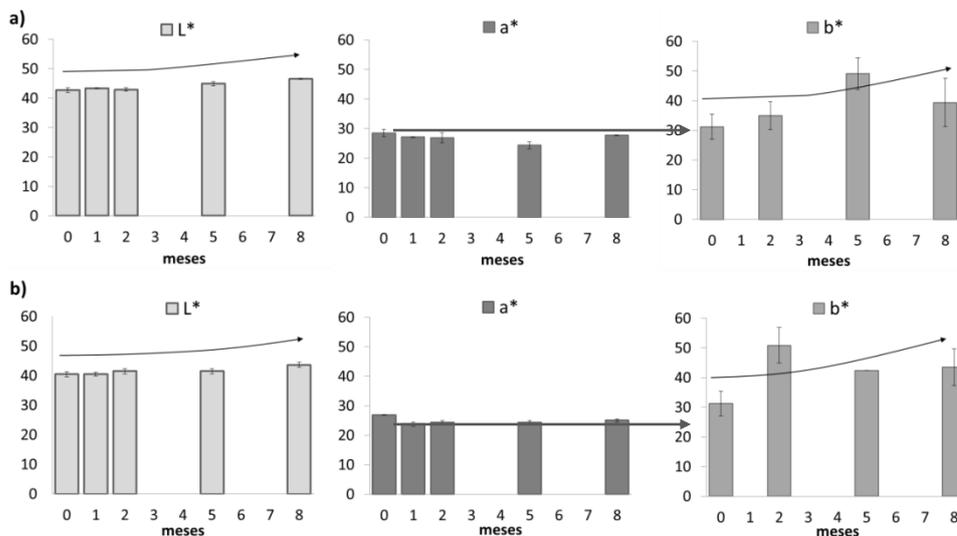


Figura 4. Atributos triestímulo durante el almacenamiento a temperatura ambiente para las muestras a) EA-ss y b) YOK-ss.

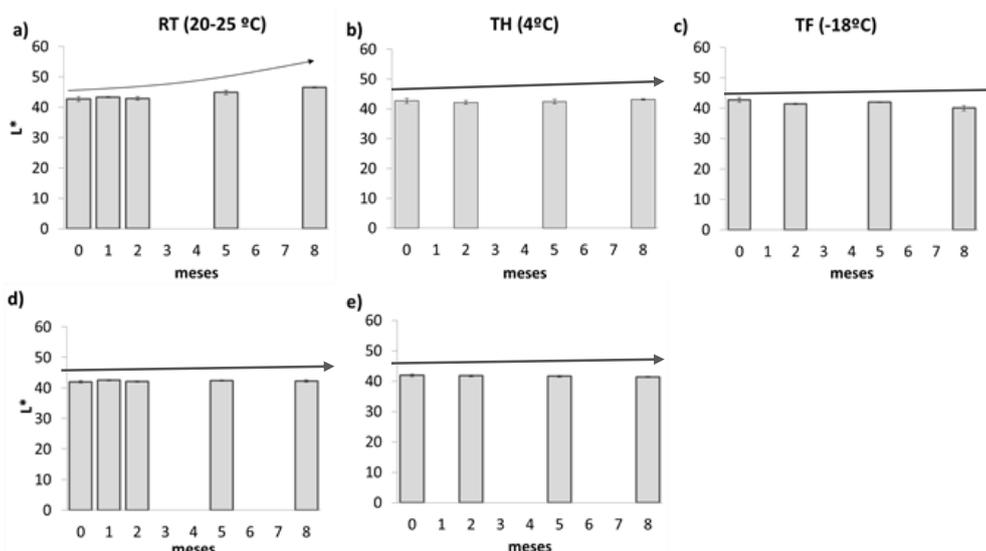


Figura 5. Variación del parámetro de luminosidad L* en las muestra EA-ss (a, b y c) y EA-cs (d y e) almacenadas a RT; heladera (TH) y freezer (TF).

El comportamiento observado para L* claramente muestra su dependencia con la concentración total de carotenoides en el pimentón. Así, el aumento de la concentración de carotenoides provoca una disminución de la luminosidad. En la **Figura 6** se representan los valores de L* obtenidos sobre muestras con distintos contenidos de carotenoides provenientes de las variedades EA y YOK, en distintas condiciones de almacenamiento. Como puede observarse, existe una dependencia marcada del valor de L* con el contenido de carotenoides totales. Esta variación de L* es mucho mayor a bajas concentraciones de carotenoides; alcanzando un valor de saturación a medida que el contenido total de carotenoides es superior a 5 g eq-cap/kg.

Es interesante observar, además, que el valor del parámetro L* no sólo depende del contenido de carotenoides totales; sino, además, del tipo varietal del cual proviene la muestra. Así, para la variedad Yokavil el valor de L* resulta ser inferior para todas las concentraciones; siendo el mismo, una característica inherente del varietal. Puede decirse, entonces, que estos valores están fuertemente influenciados, no sólo por el contenido total de carotenoides; sino, además, por el tipo de carotenoides existentes, por la relación R/Y, por la presencia de otros pigmentos, por las propiedades texturales y por la matriz vegetal sobre la que se



desarrolla el color en cada varietal. Si bien existen trabajos, en los que se proponen a los parámetros de colorimetría triestímulo como posibles indicadores para evaluar el contenido total de carotenoides, su degradación (Ramakrishnan y Francis 1973; Rhim y Hong 2011) o el agregado de semillas (Jung et al. 2011); de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que los valores que toman estos parámetros deben ser analizados con precaución cuando se comparan diferentes varietales.

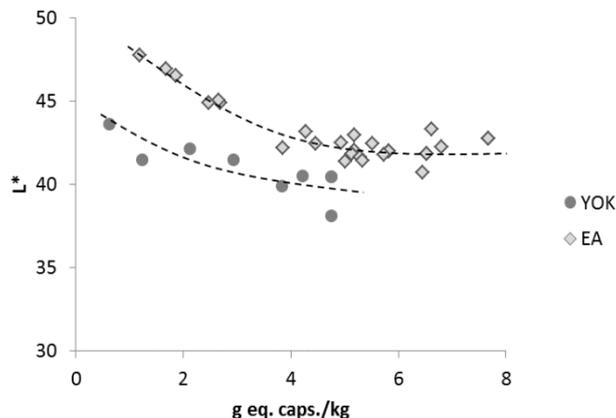


Figura 6. Parámetro de luminosidad (L^*) en función de las concentraciones de carotenoides provenientes de las muestras de EA y YOK.

Efecto del agregado de semillas de *Capsicum* durante la molienda

Tradicionalmente, el proceso de molienda del pimentón incluye la incorporación de las propias semillas del fruto con el objetivo de lograr mejores características organolépticas a través de la mejora de la sensación visual.

En los aceites de las semillas de *Capsicum* se pueden distinguir, entre otros, dos tipos de componentes: a) **los triglicéridos de distintos ácidos grasos**, principalmente el linoleico (18:2), susceptibles de generar hidroperóxidos por reacciones de lipoperoxidación; y b) **los tocoferoles**, los cuales son antioxidantes naturales presentes en diversas semillas (Speek et al. 1985). Es importante mencionar que los hidroperóxidos, que se forman por la oxidación de los ácidos grasos, son los responsables del proceso de degradación de los carotenoides; provocando la decoloración de las muestras de pimentón al disminuir la extensión de la conjugación de sus cromóforos. Al respecto, Pérez-Gálvez et al. (2004), reportaron que cuando se logra un balance óptimo entre ambos constituyentes es posible una mejor preservación de las propiedades del pimentón.

Las experiencias realizadas, muestran que la presencia de semillas en el pimentón es un factor muy importante para retardar la degradación de los carotenoides existentes. De la comparación entre las **Figura 2-a y c**, surge que el agregado de semillas durante la molienda, en muestras de EA, retarda los procesos de degradación, incluso durante el almacenamiento a RT. Cabe destacar que la incorporación de las semillas durante la molienda, permite retener, sobre las muestras EA-cs conservadas en heladera, más del 90% de los carotenoides al cabo de 8 meses; mientras que en su ausencia, éste nivel de preservación se alcanza sólo cuando las muestras son conservadas en freezer a -18°C .

Inclusive, al cabo de 24 meses de almacenamiento a RT (**Figura 7**) aún se observa el efecto protector proporcionado por los antioxidantes existentes en las semillas. Una explicación de este comportamiento es que durante la molienda conjunta del pericarpio y las semillas, se produce la salida del aceite contenido dentro de las mismas (30% aprox.); este aceite cubre las partículas coloreadas del pimentón con una fina película, disminuyendo el área expuesta al oxígeno del ambiente. En adición a esto, los tocoferoles liposolubles, presentes en el aceite, capturan los hidroperóxidos que pudieran formarse por autooxidación; previniendo de esta manera su acción sobre los pigmentos del pimentón. Por el contrario, en las muestras de EA-ss, el oxígeno del ambiente se encuentra más disponible para la degradación de los carotenoides. Esto explica la mayor velocidad de degradación de los pigmentos en las muestras sin la adición de semillas (**Figura 7**).



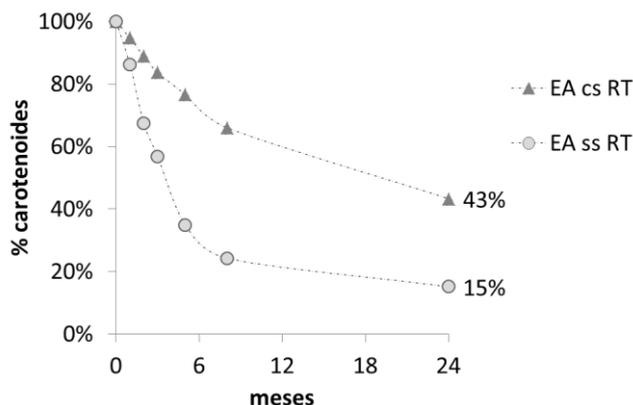


Figura 7. Efecto del agregado de semillas de *Capsicum* en la producción de pimentón. Evolución del porcentaje de carotenoides retenidos durante el almacenamiento a temperatura ambiente (RT).

Por otra parte, en el caso de las muestras molidas con semillas, se observaron los mayores incrementos en la relación R/Y al final del estudio (**Figura 3**). Mediante cromatografía HPLC, se analizaron los contenidos de los principales carotenoides presentes en las muestras, tanto al inicio como al final de la experiencia, a fin de determinar la existencia de una degradación selectiva. Se observó que en las muestras EA-cs los carotenoides que comprenden la fracción Y son degradados en una mayor proporción que los de la fracción R (**Figura 8**).

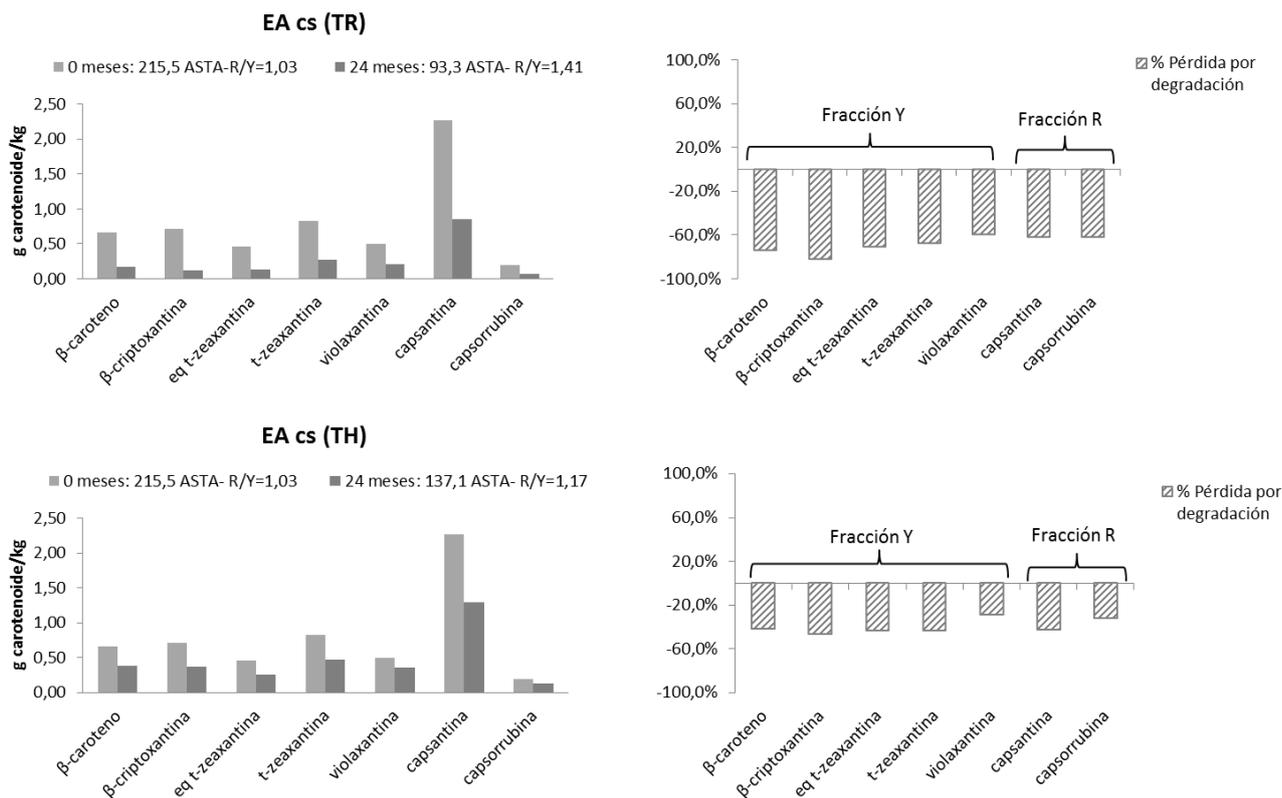


Figura 8. Contenidos individuales de los principales carotenoides presentes en muestras EA-cs conservadas a temperatura ambiente (RT) y heladera (TH). Se indican las fracciones isocrómicas R e Y.

Estimación de la degradación de las muestras en base a sus espectros de Absorción

Las reacciones de degradación oxidativa conducen a una disminución en la extensión de la conjugación de los dobles enlaces, dentro de las estructuras de los cromóforos presentes en los carotenoides. Esto provoca,



por un lado, una disminución en la intensidad del máximo de absorbancia a 460 nm (efecto hipocrómico) al mismo tiempo que se generan compuestos de degradación (“no coloreados”), que absorben a longitudes de onda por debajo de los 350 nm, en la zona del UV. Como consecuencia de este proceso de degradación, los espectros de absorción aparecen deformados, por un aumento de la absorbancia a 350 nm, respecto del que presentan los extractos de muestras sin degradar (**Figura 9**).

La **Figura 9** muestra la evolución de los espectros de absorción de los extractos acetónicos de las muestras de la variedad EA, luego de los distintos tiempos y condiciones de almacenamiento. Puede observarse que, en las muestras con menor degradación, los espectros tienden a conservar el mismo perfil que el que presentaban al inicio de estudio. Así, las muestras EA-ss conservadas a bajas temperaturas (-18°C) muestran pequeñas variaciones en los espectros de sus extractos acetónicos; mientras que los de las muestras EA-ss conservadas a temperatura ambiente presentan, con el transcurso del tiempo, no sólo un importante efecto hipocrómico a 460 nm como consecuencia de la degradación de los carotenoides; sino, además, un fuerte incremento de la absorbancia a 380 nm. De la comparación de los espectros de EA-ss y EA-cs, se aprecia también el efecto de las semillas de retardar la degradación de carotenoides, conservando el perfil del espectro de absorción durante un período mayor de tiempo.

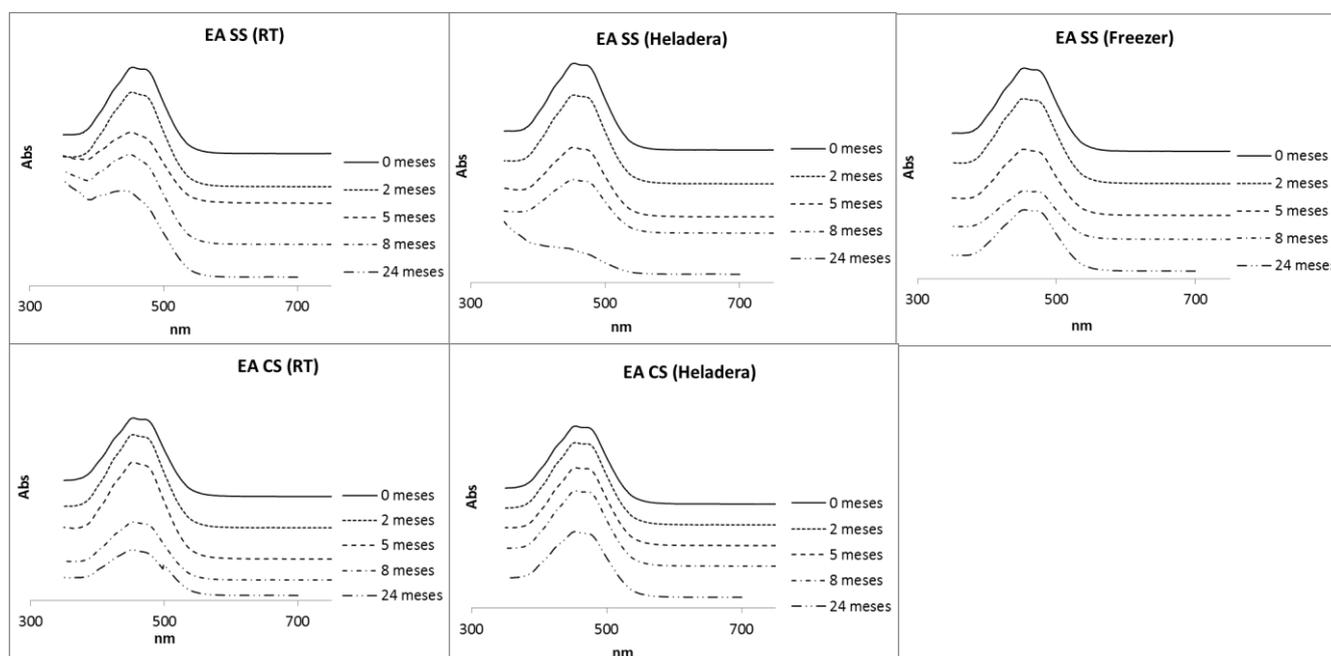


Figura 9. Evolución de los espectros de absorción UV-Vis de distintas muestras provenientes de la variedad EA conservadas a distintas temperaturas.

En base a este comportamiento de los espectros, y a fin de evaluar el grado de degradación de las muestras, se definió un *índice de degradación* (ID) que contempla, no sólo la concentración de carotenoides a 460 nm (color ASTA) sino, además, la contribución relativa de los productos de degradación, a través de la siguiente expresión (**Figura 10**):

$$ID = A/B = (A_{380\text{ nm}} - A_{575\text{ nm}}) / (A_{460\text{ nm}} - A_{575\text{ nm}}) \cdot 5$$



Contribución al ID por la formación de productos de degradación incoloros

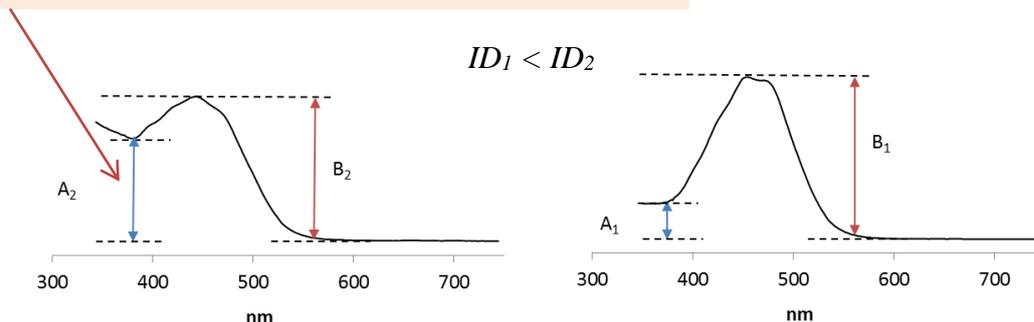


Figura 10. Expresión e interpretación gráfica del parámetro de degradación para muestras de pimentón.

En la **Figura 11**, se muestran las variaciones del ID a lo largo del tiempo de almacenamiento y el porcentaje de carotenoides retenidos en las distintas muestras. Así, luego de 24 meses de almacenamiento, las muestras muy degradadas presentan valores de ID próximos a uno ($ID \approx 1$) e importantes pérdidas de carotenoides (de hasta el 96% para EA-ss conservada en heladera). En cambio, el ID tiende a mantenerse en valores bajos en las muestras EA-ss conservadas a -18°C donde el proceso de degradación es mínimo, conservando el 86% del contenido de carotenoides inicial. De esta manera, se muestra que debido a que la sola medición del color ASTA (a 460 nm) no brinda información acerca de la formación de compuestos de degradación; el complementarla con el índice de degradación, permite evaluar la calidad de las muestras a través de una sencilla determinación espectrofotométrica adicional.

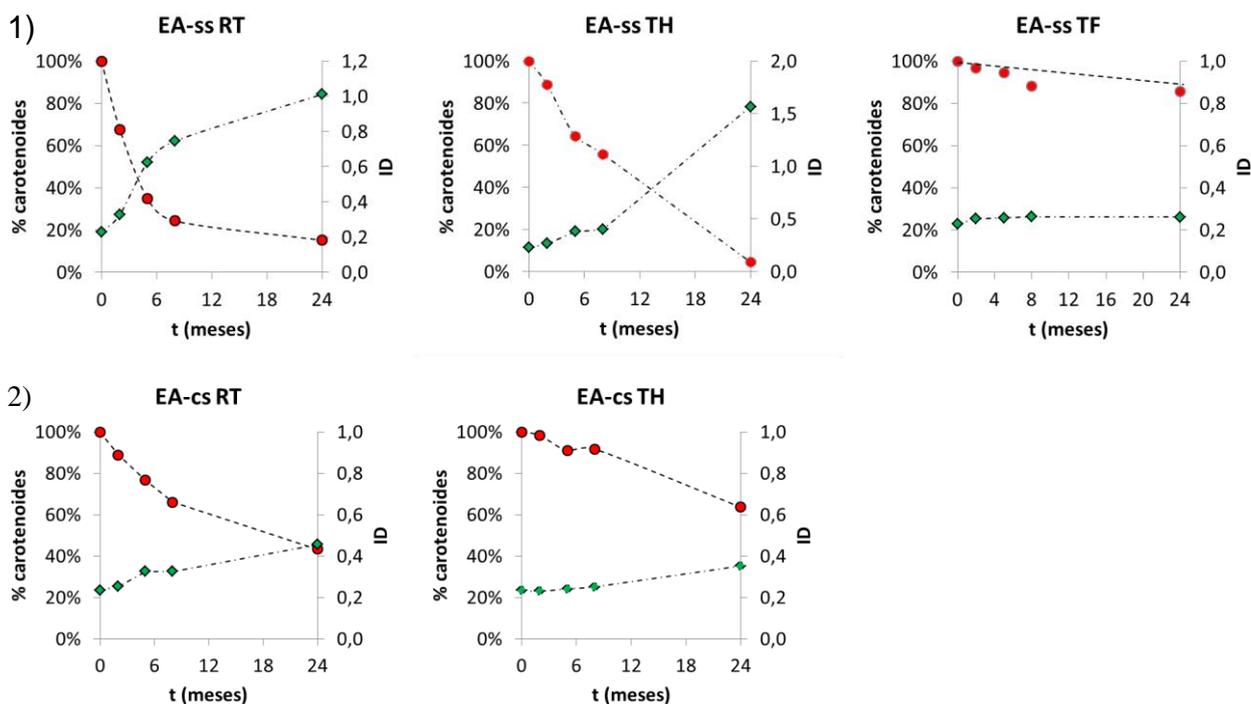


Figura 11. Porcentaje de carotenoides retenidos (●) e índice de degradación (ID) (◆) en función del tiempo (meses) de almacenamiento. Muestras EA-ss (1); EA-cs (2) almacenadas a distintas temperaturas: Ambiente (RT); Heladera (TH: 4°C) y Freezer (TF: -18°C).



CONCLUSIONES

Sobre muestras de pimentón, molidas y envasadas, la temperatura de conservación resulta ser uno de los factores más importantes para evitar los procesos de degradación de sus carotenoides.

Se observó que la pérdida de color provoca incrementos en la luminosidad, L^* ; existiendo una clara dependencia entre este parámetro, el contenido de carotenoides en las muestras y el varietal del cual proviene la muestra. Se concluyó que L^* y b^* constituyen dos parámetros sensibles al momento de evaluar la degradación del color en muestras de un mismo varietal.

El agregado de las semillas durante la molienda para la producción de pimentón permite incorporar antioxidantes propios de *Capsicum* (tocoferoles). La inclusión de los mismos preserva las propiedades colorantes del producto. De esta manera, es posible lograr una mayor estabilidad del color sin el agregado de antioxidantes exógenos.

En lo que se refiere a la temperatura de conservación, en el envase de pimentón debería sugerirse su conservación en frío y limitar su comercialización a un período no superior a los 12 meses luego de su envasado. Por su parte, muestras molidas sin semillas, que se comercializan como productos especiales, deben conservarse, luego de la molienda y envasado, a temperaturas de -18°C .

A fin de evaluar la calidad, se definió un índice de degradación, ID, basado en determinaciones espectrofotométricas de los extractos acetónicos de las muestras. Este índice, propuesto como complementario al color ASTA, refleja el grado de avance del proceso de degradación de los carotenoides. El ID, en conjunto con el valor ASTA, permiten no sólo clasificar el pimentón de acuerdo al CAA por su contenido de carotenoides totales; sino, además, determinar la existencia de procesos de degradación; ya sea por efecto del tiempo o por las malas condiciones de conservación.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Official Analytical Chemists. 2006. Carotenes and xanthophylls ind dried plant materials and mixed feeds. In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Association of Official Analytical Chemists.

ASTA. 1986. *Method 20.1-Extractable color in Capsicums and their oleoresins* (2nd ed.). *Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association*. Englewood Cliffs, NJ.

Britton G. 1995. UV/Visible Spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy* (pp. 13–62). Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag.

CIE. 2004. *Technical Report Colorimetry* (Vol. CIE 15:200). Paris.

Hornero-Méndez D, Costa-García J, Mínguez-Mosquera MI. 2002. Characterization of Carotenoid High-Producing *Capsicum annuum* Cultivars Selected for Paprika Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5711–5716.

Hornero-Méndez D, Gómez-Ladrón De Guevara R, Mínguez-Mosquera MI. 2000. Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9): 3857–64.

Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. 2001. Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8): 3584–8.

ISO The International Organization of Standarization. 1989. Reference numbrer ISO 7541:1989 (E). Genève, Switzerland.

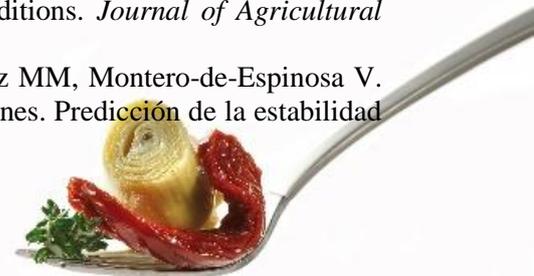
Jung JY, Kim JS, Yoo KS, Chung D, Han NS. 2011. Rapid Colorimetric Determination of Yellow Seed Content in Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Powder. *Food Analytical Methods*, 4(1): 23–27.

Mínguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D. 1994. Changes in Carotenoid Esterification during the Fruit Ripening of *Capsicum annuum* Cv. Bola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3): 640–644.

Pérez-Gálvez A, Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. 2004. Changes in the Carotenoid Metabolism of *Capsicum* Fruits during Application of Modelized Slow Drying Process for Paprika Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 518–522.

Pérez-Gálvez A, Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. 2009. Stability of Paprika without supplementary antioxidants during storage under industrial controlled conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11): 4718–4723.

Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI, Garrido-Fernández J, Lozano-Ruiz MM, Montero-de-Espinosa V. 2004. Correlación entre unidades asta-concentración carotenoides en pimentones. Predicción de la estabilidad



del color durante el almacenamiento. *Grasas Y Aceites*. CSIC.

Ramakrishnan TV, Francis FJ. 1973. Color and Carotenoid Changes in Heated Paprika. *Journal of Food Science*, 38(1): 25–28.

Rhim JW, Hong SI. 2011. Effect of water activity and temperature on the color change of red pepper (*Capsicum annuum* L.) powder. *Food Science and Biotechnology*, 20(1): 215–222.

Rodriguez-Amaya DB. 1999. *A guide for carotenoid analysis in foods* (1st ed.). Washington, DC: ILSI Press.

Speek AJ, Schrijver J, Schreurs WHP. 1985. Vitamin E Composition of Some Seed Oils as Determined by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Food Science*, 50(1): 121–124.

Wierna RV, Davies LE, Orell RE, Colodro V, Nazareno, MA, Bonini NA. 2014. Calidad y adulteración en muestras comerciales de pimentón. In A. Aguirre, A. Gonzáles, & M. Strumia (Eds.), *V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos- CICyTAC* (pp. 279–290).

Wierna RV, Davies LE, Orell RE, Colodro V, Nazareno MA, Bonini NA. 2015. Calidad y adulteración en muestras comerciales de pimentón. *La Alimentación Latinoamericana*, 315: 62–69.

Wierna RV, Nazareno MA, Bonini NA. 2013. Variación en la cantidad y el perfil de carotenoides en tres variedades de *Capsicum annuum* de la región de los Valles Calchaquíes. Efecto de la madurez del fruto. In *XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL)*. Rosario, Santa Fe, Argentina.



Influencia del estado de desarrollo sobre la calidad y comportamiento poscosecha de zapallito redondo (*Cucurbita maxima* var zapallito) refrigerado

Zarauza J.M.¹, Hasperué J.H.¹, Rodoni L.M.¹, Massolo J.F.¹, Vicente A.R.^{1,2}

¹ CIDCA: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos. Fac. Cs Exactas, UNLP. Calle 47 y 116 La Plata CP, 1900 Bs. As., Argentina.

² LIPA: Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Calle 60 y 119 s/n La Plata CP, 1900 Bs. As., Argentina.

facundomassolo@gmail.com

RESUMEN

Los zapallitos son hortalizas de fruto de producción estival ampliamente cultivados en las principales regiones hortícolas del país. Los frutos son cosechados cuando aún se encuentran en estado inmaduro lo que hace que puedan comercializarse en diversos estados de desarrollo. La información existente acerca de cómo el estado de madurez a la cosecha afecta la calidad, la composición y el comportamiento poscosecha de esta especie es muy limitada. En este trabajo se determinaron los cambios en la calidad (índice de deterioro, color, pigmentos, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, firmeza, pérdida de peso, tasa respiratoria y acidez) de frutos de zapallito cosechados en tres estados de desarrollo: I) “baby” (25-35 mm de diámetro), II) desarrollo intermedio (65-75 mm de diámetro) y III) desarrollo avanzado (85-95 mm diámetro) durante el almacenamiento por 0, 12, 19 y 26 días a 5°C. Los frutos más desarrollados se mostraron más firmes y de color verde más oscuro que los frutos pequeños. Por otro lado, los zapallitos “baby” resultaron más ricos en antioxidantes carotenoides y de naturaleza fenólica que los frutos de mayor desarrollo, aunque presentaron un menor contenido de antioxidantes hidrofílicos totales. La composición y el comportamiento poscosecha de los frutos cosechados en los estados II y III fueron en términos generales comparables. Por su parte los zapallitos “baby” presentaron una mayor actividad metabólica y fueron más susceptibles al amarilleamiento, ablandamiento y deshidratación que los estados II y III. La vida útil a 5°C de los frutos “baby” fue de 19+2 mientras que para el estado intermedio y el avanzado ésta se prolongó una semana más.

240

Palabras claves: *fruto, calidad, capacidad antioxidante, almacenamiento, poscosecha.*

ABSTRACT

Summer squashes are widely produced fruiting vegetables in most horticultural regions. Given that the fruits are harvested when still immature they could be marketed at developmental stages. Unfortunately the information available regarding the influence of fruit maturity at harvest on quality, composition and postharvest responses is very limited. In this work, we evaluated the changes in quality (deterioration index, color, pigments, antioxidant capacity, phenolic compounds, firmness, weight loss, respiration rate and acidity) of summer squash fruit harvested in three stages of development: I) “baby”, II) intermediate stage and III) advanced stage during storage for 0, 12, 19 and 26 days at 5 °C. The fruit turn darker and firmer as development progressed. “Baby” squashes were richer in carotenoid and phenolic antioxidants though they had lower levels of total hydrophilic antioxidants. The composition and postharvest behavior of fruit harvested in stages II and III showed no major differences. In contrast “baby” squashes had higher metabolic rate and were more susceptible to postharvest yellowing, softening dehydration. The shelf life at 5 °C for “baby” fruits was 19+2 d while for the intermediate and advanced stages it lasts a week more.

Keywords: *fruit, quality, antioxidant capacity, storage, postharvest.*

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de frutos involucra una serie de cambios físicos y químicos (Kilcher 1981) cuyo conocimiento es de suma importancia puesto que determina la calidad y en muchos casos afecta su respuesta al almacenamiento luego de la recolección. Las *Cucurbitáceas* constituyen una familia con varias especies productoras de frutos de interés comercial. (Kader 2002, Bermejo y Cano 2012). Este grupo es muy diverso incluyendo especies de frutos climatéricos (melón, sandía) y no climatéricos (pepino, zapallo). Asimismo,



algunas especies se cosechan en estados de pleno desarrollo, aunque otras como los zapallitos y el pepino, son separadas de la planta antes de dicho estado (Albertini et al. 2006, Kamol et al. 2014, Rahman et al. 2014).

El zapallito es una hortaliza de importancia en términos de producción en la Argentina. Se produce en zonas templadas en el periodo estival o bien en épocas frías de regiones más cálidas para atender a la demanda de la región Metropolitana, principal centro de consumo de alimentos del país (De Grazia et al. 2003). Para los canales de distribución tradicionales los frutos se cosechan en un estado de desarrollo intermedio (antes de que se complete el endurecimiento de la piel y el desarrollo de las semillas), lo que no compromete los rendimientos en forma marcada (Cantwell y Kasmire 2002). De todos modos, existe un período ontogénico bastante amplio en el cual pueden comercializarse y no se conoce si dentro de esta “ventana” de cosecha los frutos muestran diferencias en su composición y comportamiento durante el almacenamiento refrigerado. En otros frutos esto ha sido estudiado en detalle (Bermejo y Cano 2012, Zaro et al. 2014). Sin embargo, la información referida a la calidad y fisiología de desarrollo de zapallitos redondos es muy limitada. El objetivo del presente trabajo fue analizar la influencia del estado de desarrollo sobre la calidad y el comportamiento poscosecha de esta hortaliza inmadura almacenada a 5°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se cosecharon zapallitos en estados de desarrollo “baby” (I), intermedio (II) y avanzado (III), producidos a campo en la zona de La Plata en octubre de 2015 y se transportaron rápidamente al laboratorio. Se eliminaron frutos defectuosos, se lavaron con agua clorada (100 mg L⁻¹) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para cada estado de desarrollo, I, II y III, se confeccionaron 12 bandejas plásticas (3 por día de almacenamiento) con 10, 4 y 3 frutos respectivamente. Las bandejas se cubrieron con PVC perforado y se almacenaron a 5 °C por 0, 12 o 19 días para posteriormente transferirse a 20°C por 2 días. Durante el período de almacenamiento se tomaron muestras de frutos de los diferentes estadios de desarrollo y se determinó un índice de deterioro, color de piel, firmeza, pérdida de peso y tasa respiratoria. Una muestra representativa de frutos se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Se realizaron determinaciones de carotenoides, clorofilas, capacidad antioxidante hidrofílica, contenido de compuestos fenólicos y acidez. Las determinaciones se llevaron a cabo según se describe a continuación.

Determinaciones analíticas

Índice de deterioro: Se calculó un índice de deterioro considerando el ablandamiento, la decoloración superficial (amarilleamiento), la incidencia de hongos y la deshidratación. Se utilizó una escala hedónica de 0 a 4 para cada defecto, siendo: 0= sin deterioro, 1= leves defectos, 2= deterioro moderado y 3= pobre y 4= deterioro marcado. El final de la vida útil se consideró con deterioro moderado (nivel 2). El índice de deterioro se calculó según:

$$ID = \frac{\sum (\text{nivel de deterioro (D)} \times \text{N}^\circ \text{ de frutos en ese nivel})}{\text{N}^\circ \text{ total de frutos}} \quad (1)$$

Color de piel: Se obtuvieron los parámetros L*, a* y b* con un colorímetro y se calculó el ángulo Hue según $H = 180 - \text{tg}^{-1} b^*/a^*$. Se realizaron 20 mediciones por estado de desarrollo para cada día de almacenamiento.

Firmeza: se llevó a cabo un test de ruptura en un texturómetro equipado con una sonda de 3 mm de diámetro a una velocidad de 1 mm s⁻¹. Se realizaron 20 mediciones por estado de desarrollo para cada día de almacenamiento.

Pérdida de peso: Los frutos se pesaron individualmente al inicio del ensayo (PI) como durante el período de almacenamiento (PF). Se realizaron 6 mediciones por estado de desarrollo para cada día de almacenamiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso como se describe a continuación:

$$PP (\%) = \frac{100 \times (PI - PF)}{PI} \quad (2)$$

Tasa respiratoria (TR). Se colocaron todos los frutos de cada bandeja en un frasco hermético y se incubaron por 10 min a 20°C. Se registró la concentración CO₂ en el espacio de cabeza con un sensor IR (Alnor



Compu-flow, modelo 8650). Se realizaron 3 mediciones por estado de desarrollo para cada día de almacenamiento. Los resultados se expresaron como $\text{mmol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Capacidad antioxidante contra el radical ABTS^{•+}. Se molieron aproximadamente 50 g de fruto congelado y con el polvo obtenido se obtuvieron extractos etanólicos. La determinación de la capacidad antioxidante se realizó de acuerdo a Arnao et al. (2001), basándose en la reducción de la absorbancia a 734 nm de la solución de ABTS^{•+} por parte de los antioxidantes presentes el extracto etanólico. Se utilizó Trolox® como antioxidante patrón y los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) en mg kg^{-1} .

Fenoles totales. Se determinaron de acuerdo a Massolo et al. (2014), a partir de un extracto etanólico de tejido congelado y pulverizado como se indicó anteriormente.

Carotenoides totales. Se molieron aproximadamente 50 g de tejido congelado y con el polvo obtenido se obtuvieron extractos con hexano:acetona:etanol (2:1:1). Luego de la separación de fases se midió la absorbancia a 454 nm sobre la fase hexano. El contenido de carotenoides se calculó empleando un coeficiente de extinción $1,39 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Clorofila total. Se molieron aproximadamente 50 g de tejido congelado y con el polvo obtenido se obtuvieron extractos con acetona:agua (80:20). El contenido de clorofilas totales se determinó según Lichtenthaler (1987).

Acidez. Se molieron aproximadamente 50 g de fruto, se pesaron 10 g y se agregaron sobre 100 mL de agua. La acidez se determinó por titulación con NaOH (0,01 N) hasta pH 8,2 (AOAC 1980).

Deformación a la ruptura. Se evaluó en un texturómetro (Texture Expert, modelo TA.XT2, EEUU) equipado con una sonda de 3 mm de diámetro. Cada fruto se comprimió 10 mm en la zona ecuatorial a una velocidad de 1 mm s^{-1} . Se registró la deformación a la ruptura (o distancia a la ruptura) del tejido. Se realizaron 20 medidas para cada estado de desarrollo y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron en mm.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño factorial. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon por el Test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Índice de deterioro

Los frutos del estado I se mostraron a día 19+2 más deteriorados (opacos, amarillentos, deformes y blandos) que los de los estados II y III (**Fig. 1A**), lo cual se vio reflejado además en un mayor índice de deterioro (**Fig. 1B**). Esto es, los primeros llegaron al final de su vida útil a los 19+2 d mientras que los frutos más desarrollados se mantuvieron por una semana más (26+2 d). Resultados similares fueron encontrados por Zaro et al. (2014) en frutos de berenjena, donde los frutos de menor desarrollo resultaron más susceptibles al deterioro durante el almacenamiento.



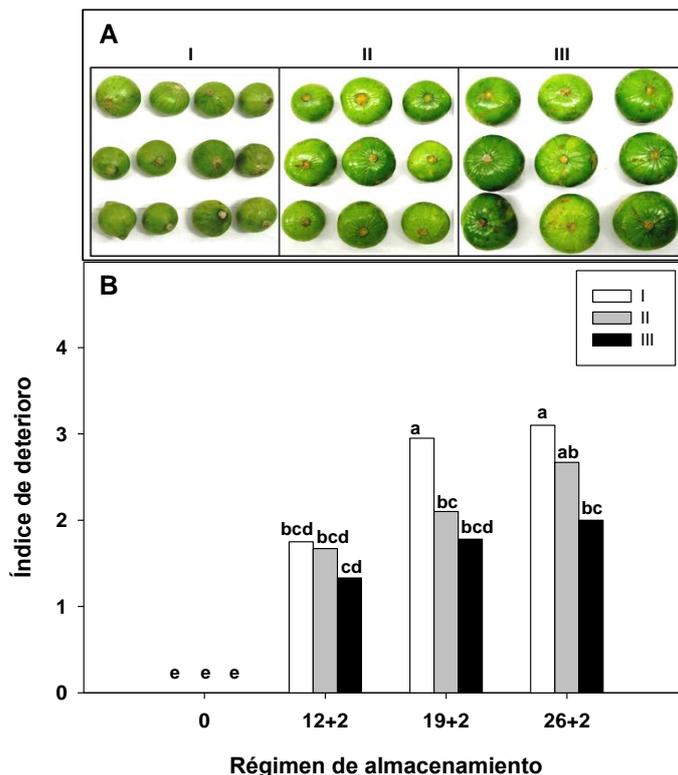


Figura 1: A) Apariencia de zapallitos en estados de desarrollo I, II y III luego de 19 d a 5°C y 2 d a 20 °C. B) Índice de deterioro de frutos almacenados por 0, 12, 19 y 26 días a 5 °C y luego transferidos a 20 °C por 2 días (“+2”). Letras distintas indican diferencias significativas en un test de Fisher ($P < 0,05$).

Color superficial

Los zapallitos más pequeños (estado I o “baby”) fueron los que presentaron mayor luminosidad (L^*) durante el almacenamiento, seguido por los del estado II y III (**Fig. 2 A**). El color verde de todos los frutos se redujo durante el almacenamiento, pero esta disminución fue más acelerada en los menos desarrollados (**Fig. 2 B**). Los frutos del estadio III y II conservaron su color hasta 14 (12+2) y 9 (7+2) d respectivamente, mientras que en los frutos del estado I, la degradación de la tonalidad verde ya se evidenció a los 9 d del almacenamiento. (**Fig. 2 B**).



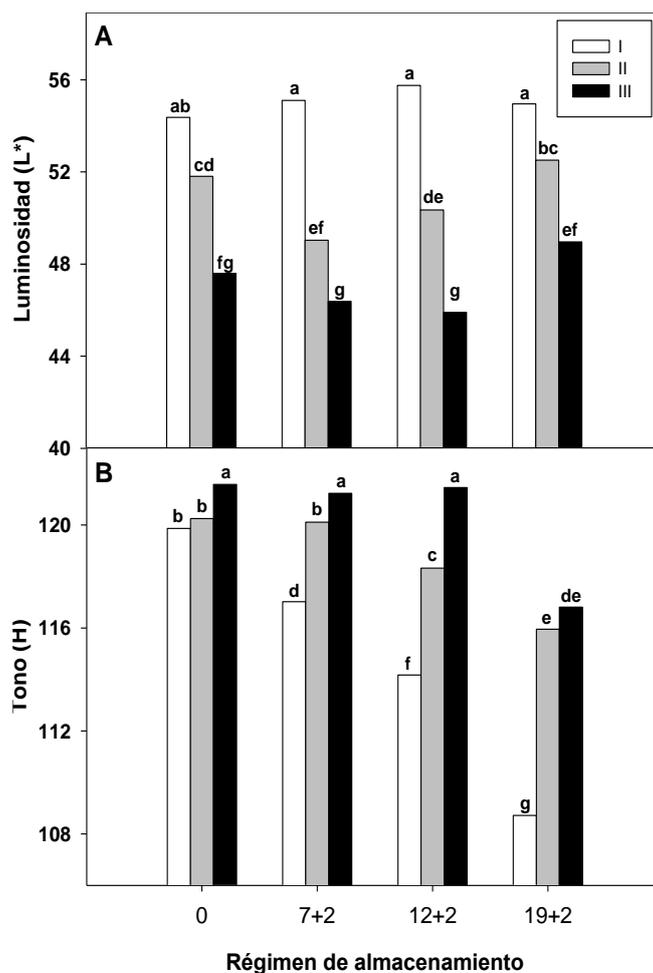


Figura 2: A) Luminosidad (L*) y B) tono (H) de zapallitos en estados de desarrollo I, II y III almacenados por 0, 12, 19 y 26 días a 5 °C y luego transferidos a 20 °C por 2 días (“+2”). Letras distintas indican diferencias significativas en un test de Fisher (P < 0,05).

Contenido de carotenoides y clorofilas

La coloración amarillenta observada correlacionó con un mayor contenido de carotenoides (**Fig. 3 A**), así como ha sido demostrado por otros autores (Guzman et al. 2010, Khoo et al. 2011). El contenido de carotenoides fue notablemente superior en frutos “baby” respecto de los estados más avanzados, incrementándose hacia el final del almacenamiento. Por otro lado, en el caso de los frutos de los estados II y III, éstos presentaron contenidos de carotenoides similares entre sí, con un leve incremento hacia el día 12+2. El contenido de clorofilas en todas las muestras fue superior hacia el día 12+2, aunque la posterior disminución con el tiempo de almacenamiento fue más marcada en el estado I respecto de los otros (**Fig. 3 B**). La evolución del contenido de clorofilas fue similar en los estados II y III, disminuyendo hacia el final del almacenamiento aunque en menor medida que el estado I.



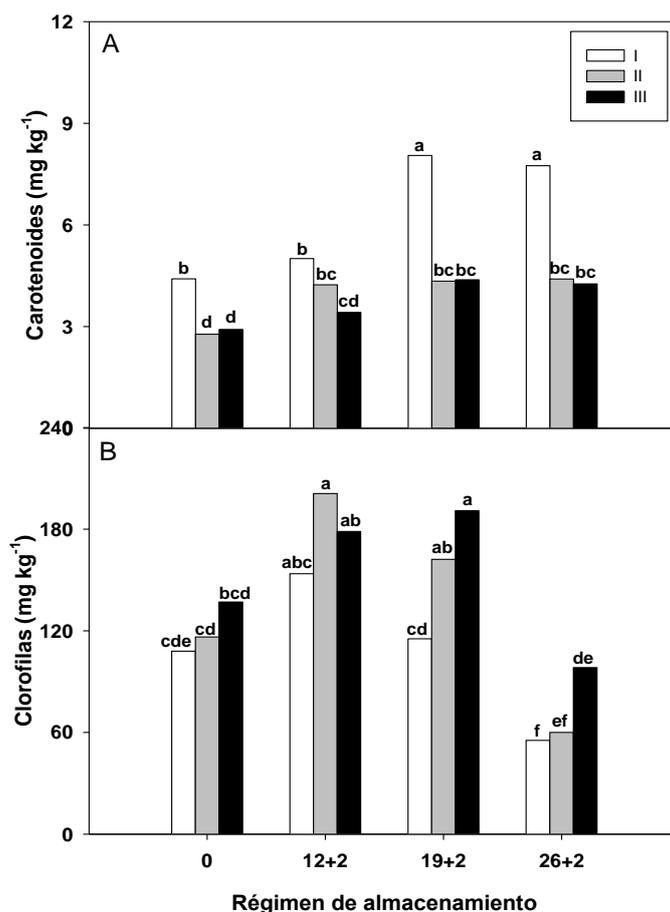


Figura 3: A) Contenido de carotenoides y de B) clorofilas de zapallitos en estados de desarrollo I, II y III almacenados por 0, 12, 19 y 26 días a 5 °C y luego transferidos a 20 °C por 2 días (“+2”). Letras distintas indican diferencias significativas en un test de Fisher ($P < 0,05$).

Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos

De forma general, se encontró que a mayor estado de desarrollo, mayor capacidad antioxidante contra $ABTS^{+}$. Esto se observó principalmente hacia los días 12+2 y 26+2 (**Fig. 4 A**). Hacia el final del almacenamiento, el contenido de antioxidantes totales en los estados I y II fue similar al del día inicial. Contrariamente en el estado más avanzado se observó un incremento en la capacidad antioxidante durante el periodo de almacenamiento. En contraposición con lo observado en la capacidad antioxidante total, el contenido de fenoles fue superior en los estados de desarrollo más tempranos, siendo el estado I el que presentó los niveles más altos de fenoles durante todo el almacenamiento (**Fig. 4 B**). Una tendencia similar fue hallada por otros autores en frutos de mirto y berenjena en diferentes estados de desarrollo (Bae et al. 2014, Balamurugan et al. 2014, Zaro et al. 2014). La relación opuesta entre fenoles totales y capacidad antioxidante sugiere que los primeros no constituyen los principales antioxidantes hidrofílicos en zapallito. En consecuencia, en futuros ensayos debería considerarse la cuantificación de otro tipo de antioxidantes en zapallito, como por ejemplo, vitamina C.



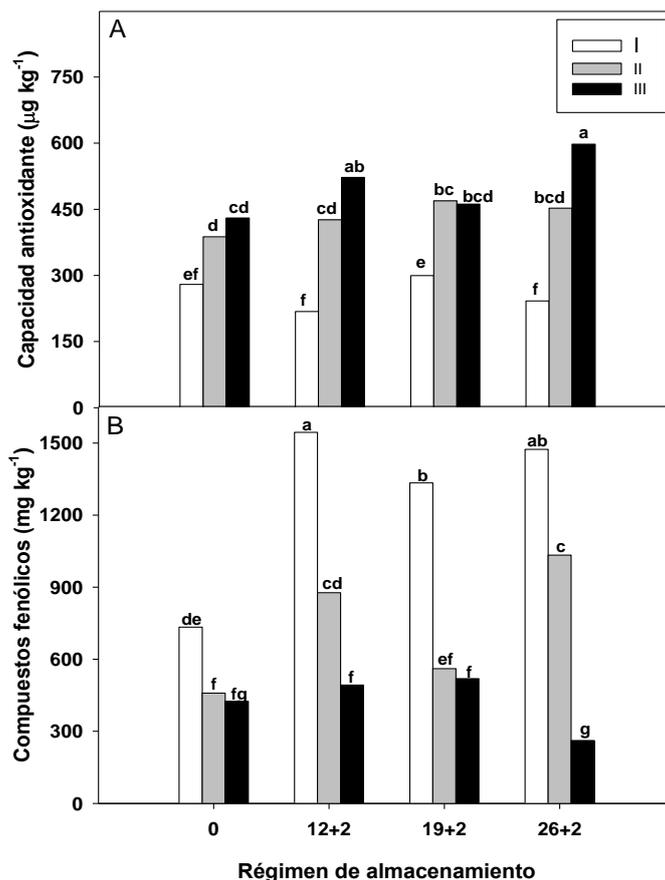


Figura 4: (A) Capacidad antioxidante y (B) contenido de compuestos fenólicos de zapallitos en estados de desarrollo I, II y III almacenados por 0, 12, 19 y 26 días a 5 °C y luego transferidos a 20 °C por 2 días (“+2”). Letras distintas indican diferencias significativas en un test de Fisher ($P < 0,05$).

Deformación a la ruptura (DR)

A tiempo 0, la DR no presentó diferencias entre los estados de desarrollo. Por otro lado, si bien los frutos en estado II y III también mostraron un aumento de la DR durante el almacenamiento, lo cual equivale a una pérdida de firmeza, ésta se incrementó más marcadamente en los zapallitos "baby". Esta dependencia de la firmeza con el estado de desarrollo ha sido demostrada por otros autores en frutos de pepino (O'Donoghue et al. 1997), una *cucurbitácea* que se consume en estado inmaduro como el zapallito. A su vez, este comportamiento diferenciado puede deberse a una distinta susceptibilidad a la pérdida de peso entre estadios, que es bien sabido que puede afectar marcadamente la textura (Zhang et al. 1996).



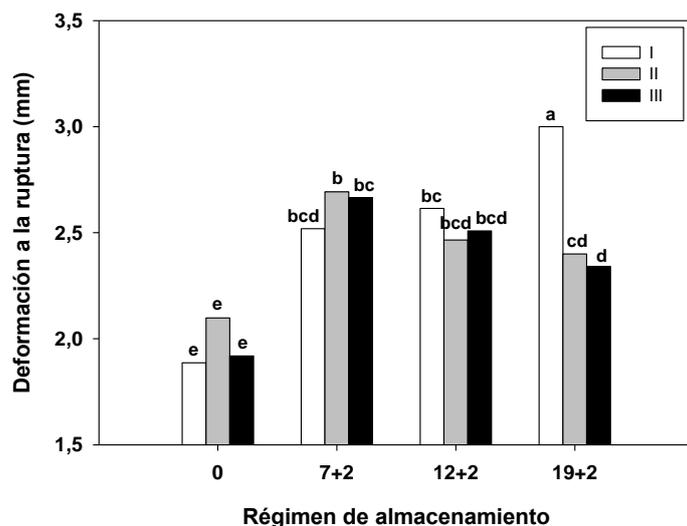


Figura 5: Distancia de ruptura de zapallitos en estados de desarrollo I, II y III almacenados por 0, 12, 19 y 26 días a 5 °C y luego transferidos a 20 °C por 2 días (“+2”). Letras distintas indican diferencias significativas en un test de Fisher ($P < 0,05$).

Pérdida de peso y tasa respiratoria

La pérdida de peso (**Fig. 6 A**) aumentó a lo largo del almacenamiento llegando a ser de casi un 10% en frutos “baby” al último día (26+2), mientras que para los estados II y III ésta resultó ser alrededor de un 50% menor. Como es esperable la deshidratación fue más marcada en los frutos más pequeños por su mayor relación superficie volumen. De todos modos es también esperable que en estadios más tempranos el desarrollo de la cutícula sea incompleto (Suslow y Cantwell 2013a, c), lo que podría reducir la resistencia a la pérdida de vapor de agua y/o exudación. Con respecto a la tasa respiratoria (TR), al comenzar el almacenamiento, los frutos del estado I presentaron un mayor valor en comparación con los más avanzados en desarrollo (**Fig. 6 B**), lo cual podría correlacionarse con la menor vida poscosecha de los primeros respecto de los últimos (**Fig. 1 B**). Ambos parámetros demuestran que el metabolismo es más acelerado en los frutos del estado I respecto del II y III, que además se comportan de forma similar entre sí.



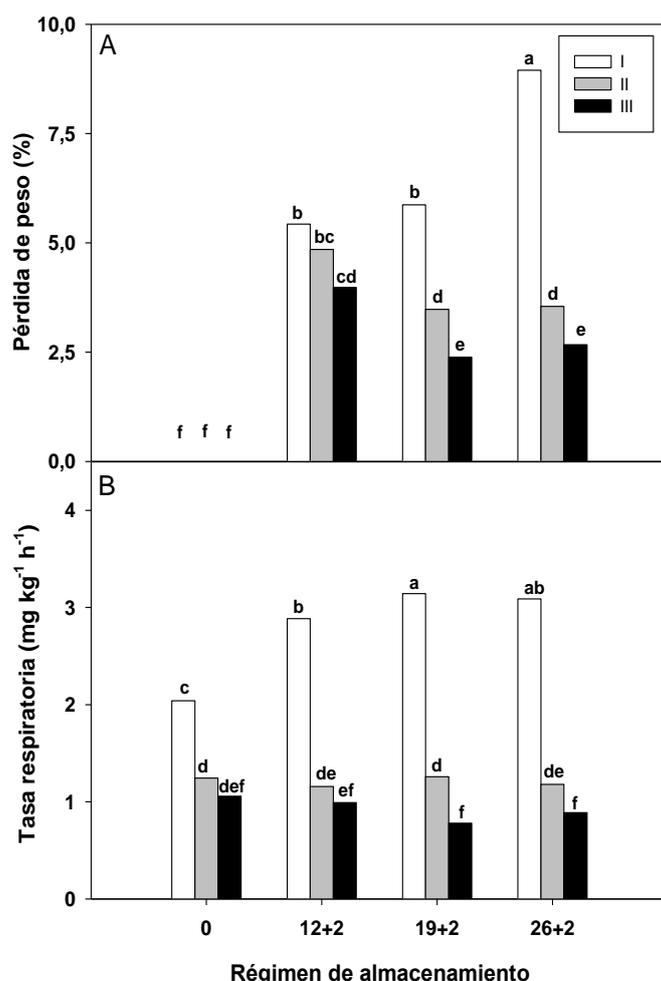


Figura 6: A) Pérdida de peso y B) tasa respiratoria de zapallitos en estados de desarrollo I, II y III almacenados por 0, 12, 19 y 26 días a 5 °C y luego transferidos a 20 °C por 2 días (“+2”). Letras distintas indican diferencias significativas en un test de Fisher (P < 0,05).

Acidez

Al inicio del almacenamiento hubo una tendencia a una mayor acidez en los frutos con menor grado de desarrollo (**Fig. 7**). Si bien en las frutas el proceso de maduración implica una reducción en la acidez, en otros frutos la relación puede ser contraria, por ejemplo el fruto rojo de pimiento duplica al verde en acidez. Con el devenir del almacenamiento la diferencia de acidez del estado I por sobre los estados II y III se incrementa notoriamente, llegando a ser 100% y 200% mayor a los 12+2 d y 26+2 d respectivamente. Esto puede ser atribuido a que cuanto menor es el estado de desarrollo mayor es el contenido de materia seca de los zapallitos como hemos demostrado en estudios previos (Massolo et al. 2015), esto es, menor contenido de humedad. Al final del almacenamiento, la presencia de procesos fermentativos debida al ataque microbiano (sobre todo en los frutos más susceptibles al deterioro), podría contribuir a la acidez final. Sin embargo, esto no sería un aporte tan importante como el sugerido por la concentración de ácidos en los tejidos.



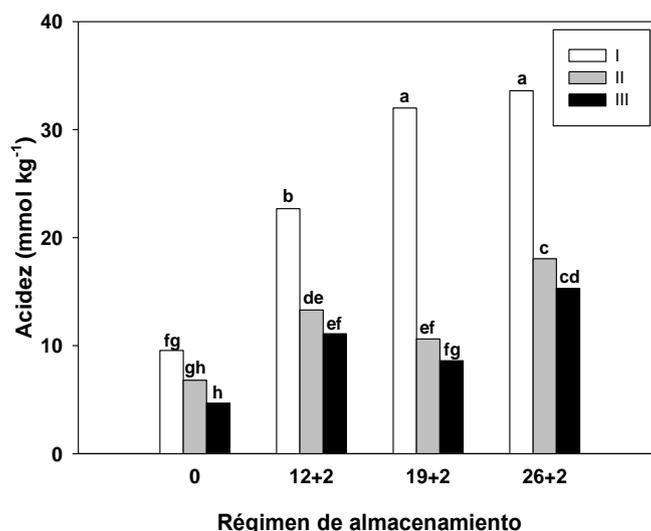


Figura 7: Acidez de zapallitos en estados de desarrollo I, II y III almacenados por 0, 12, 19 y 26 días a 5 °C y luego transferidos a 20 °C por 2 días (“+2”). Letras distintas indican diferencias significativas en un test de Fisher ($P < 0,05$).

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió realizar una caracterización fisiológica y composicional de frutos de zapallito redondo en diferentes estadios de desarrollo para los que la información disponible es muy escasa. Asimismo, se evaluó el comportamiento poscosecha de los frutos en función de su grado de madurez. Los zapallitos “baby” resultaron más ricos en antioxidantes carotenoides y de naturaleza fenólica que los frutos desarrollados, aunque presentaron un menor contenido de antioxidantes hidrofílicos totales. La composición y el comportamiento poscosecha de los frutos cosechados en los estados II y III fueron, en términos generales, comparables. Por su parte los zapallitos “baby” presentaron una mayor actividad metabólica y fueron más susceptibles al amarilleamiento, ablandamiento y deshidratación que los estados II y III. La vida útil a 5 °C de los zapallitos “baby” fue de 19+2 d mientras que para los frutos de mayor desarrollo (intermedio y avanzado) ésta se extendió hasta los 26+2 d.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. pp 359.
- Albertini MV, Carcouet E, Pailly O, Gambotti C, Luro F, Berti L. 2006. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 8335-8339.
- Arnao, MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 73, 239-244.
- Bae H, Yun SK, Jun JH, Yoon IK, Nam EY, Kwon JH. 2014. Assessment of organic acid and sugar composition in apricot, plumcot, plum and peach during fruit development. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 87, 24-29.
- Balamurugan S. 2014. Fruit maturity, phenolic content and antioxidant activity of *Eugenia jambolana* Lam fruit. *International Letters of Natural Sciences*. 13, 41-44.
- Bermejo A, Cano A. 2012. Analysis of nutritional constituents in twenty citrus cultivars from the mediterranean area at different stages of ripening. *Food and Nutrition Sciences*. 3, 639-650.
- Cantwell M, Kasmire RF. 2002. Postharvest handling systems: fruit vegetables. En: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Third edition. Edit. A.A. Kader. University of California. 33: 407-421.
- De Grazia J, Tiftonell PA, Perniola OS, Caruso AC, Chiesa A. 2003. Precocidad y rendimiento en Zapallito Redondo del Tronco (*Cucurbita maxima* var. zapallito (Carr.) Millán) en función de la relación nitrógeno:potasio. *Agricultura Técnica*. ISSN 0365-2807.



- Guzman I, Hamby S, Romero J, Bosland PW, O'Connell MA. 2010. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Science*. 179, 49-59.
- Kader AA (Ed.). 2002. *Postharvest technology of horticultural crops*, 3ra edición. University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311, 535 pp.
- Kamol SI, Howlader J, Sutra Dhar GC, Aklimuzzaman M. 2014. Effect of different stages of maturity and postharvest treatments on quality and storability of pineapple. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 12, 251-260.
- Khoo HE, Prasad N, Kong KW, Jiang Y, Ismail A. 2011. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*. 16, 1710-1738.
- Kilcher, MR. 1981. Plant development, stage of maturity and nutrient composition. *Journal of Range Management Archives*. 34, 363-364.
- Massolo JF, Lemoine ML, Chaves AR, Concellón A, Vicente AR. 2014. Benzyl-aminopurine (BAP) treatments delay cell wall degradation and softening, improving quality maintenance of refrigerated summer squash. *Postharvest Biology and Technology*. 93, 122-129.
- Massolo JF. 2015. Evaluación del uso de reguladores vegetales y de estrategias de procesamiento para reducir el deterioro post-cosecha de zapallitos (Tesis doctoral). Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.
- O'Donoghue EM, Somerüeld SD, de Vre• LA, Heyes JA. 1997. Developmental and ripening-related effects on the cell wall of pepino (*Solanum muricatum*) fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 73, 455-463.
- Rahman, M. M., Moniruzzaman, M., Ahmad, M. R., Sarker, B. C., Alam, M. K. 2016. Maturity stages affect the postharvest quality and shelf-life of fruits of strawberry genotypes growing in subtropical regions. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 15, 28-37.
- Suslow TV, Cantwell M. 2013a. Cucumber: recommendations for maintaining postharvest quality. En: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Cucumber/>. Última actualización: 7 de noviembre, 2013.
- Suslow TV, Cantwell M. 2013b. Squash (soft rind): recommendations for maintaining postharvest quality. En: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Squash/>. Última actualización: 6 de junio, 2013.
- Yemm EW, Willis AJ. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*. 57, 508-514.
- 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.
- Zhang X, Brusewitz GH, Puchalski C. 1996. Postharvest peach weight loss, water content, and outer layer firmness. *International Agrophysics*. 10, 139-143.

