ÁREA INGENIERÍA Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
TRABAJOS COMPLETOS

ÍNDICE

01TCA - Estrategias tecnológicas para obtener yogur alto en proteínas. Influencia sobre parámetros fisicoquímicos y de textura..... 13

02TCA - Estudio computacional del efecto del pH y la concentración de sal en el potencial electrostático de α-lactoalbumina. 21

03TCA - Estudio de la adición de quitooligosacáridos a yogur y su efecto en la digestibilidad *in vitro* de lípidos. 29

04TCA - Impacto del uso de leche enriquecida con leche en polvo descremada y de cultivos adjuntos en los perfiles de maduración de queso Cremoso 36

05TCA - Inhibición de la precipitación del L-lactato de calcio por el Caseinomacropéptido a pH neutro..... 45

06TCA - Yogur incrementado en proteínas, reducido en lactosa y con agregado de una bacteria potencialmente probiótica. Efecto de la formulación en propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y reológicas. 51

07TCA - Elaboración de premezcla para pan a partir de harina de bagazo (BSG) y levaduras agotadas (BSY) recuperadas de la elaboración de cerveza artesanal. 61

08TCA - Harina de trigo enriquecida con harina de semillas de amaranto germinadas: calidad tecnológica de los panes. 68

09TCA - Masas congeladas para la obtención de panes dulces con incorporación de harina de fruto de algarrobo: Efecto del almacenamiento congelado sobre la calidad de los productos..... 76

10TCA - Maní Exportación: Monitoreo y control estadístico de cuerpos extraños en procesos de alta calidad. 85

11TCA - Bacterias lácticas nativas de interés industrial aisladas a partir de arándanos frescos (*Vaccinium corymbosum*)..... 92

12TCA - Efecto de la tecnología y condiciones de secado en el contenido de componentes bioactivos y minerales de microalga *Scenedesmus obliquus*. 101

13TCA - Evaluación del crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en diferentes cultivos para su utilización como bioinsumo agrícola. 111

14TCA - Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de *Rosa gallica* sobre bacterias bucales Gram (+)..... 123

15TCA - Purificación de galactooligosacáridos por fermentación 131

16TCA - Caracterización de los distintos estilos de cerveza artesanal de mayor consumo elaboradas en el Partido de Luján Provincia de Buenos Aires. 138

17TCA - Caracterización química de vinos Malbec y Cabernet franc provenientes de dos localidades de La Pampa (Argentina), en relación al grado de madurez de las uvas..... 145

18TCA - Vinificaciones orgánicas espontáneas del Sur Mendocino: parámetros enológicos y microbiológicos. 156

19TCA - Caracterización de bagazos provenientes de diferentes estilos de cerveza artesanal y recuperación alcalina de proteínas. 162

20TCA - Co-encapsulación de aceite de chía y antioxidantes naturales..... 170

21TCA - Efecto de la cantidad de nuez prensada en la calidad y rendimiento de obtención de aceite de nuez pecán Starking [*Carya illinoinensis* (Wangenh.) K.Koch] 181

22TCA - Estabilidad física y bioaccesibilidad de ácidos grasos omega 3 en nanoemulsiones de aceite de chía estabilizadas con Tween 80 y saponina quillaja. 189

23TCA - Optimización de la extracción del mucílago de chía asistida por ultrasonidos de alta intensidad 195

24TCA - Comparación de las propiedades mecánicas y ópticas de películas compuestas de WPI+pectina adicionadas con miel de abejas sin aguijón o de *Apis mellifera*..... 208

25TCA - Detección de adulteración de mieles de abeja por medio de relaciones isotópicas de carbono. 214

26TCA - Optimización de la impregnación a vacío suave de naranjas frescas cortadas con miel..... 218

27TCA - Nuevas fuentes de biopolímeros y su potencial aplicación en la industria alimentaria 227

28TCA - Soluciones formadoras de películas enriquecidas con extractos naturales y su potencial aplicación en la industria alimentaria 235

29TCA - Desarrollo de un nuevo producto: Costillar de conejo salado y curado. 244

30TCA - Desarrollo de una planta industrial para elaboración de concentrados proteicos de soja y arvejas..... 251

31TCA - Efecto del contenido de humedad en propiedades físicas y mecánicas de semillas de limón. 258

32TCA - Evaluación de la extracción de compuestos desde semillas de limón: efecto de humedad y calidad de solventes..... 269

33TCA - Validación del método de la elipse que mejor ajusta para la determinación de las dimensiones de granos y semillas con ImageJ®. 278

34TCA - Aprovechamiento del residuo industrial del membrillo para la extracción de pectinas empleando tecnología ecoamigable..... 285

35TCA - Contenido de sorbato de potasio residual en ciruelas tiernizadas según el método de deshidratación..... 293

36TCA - Acacia negra: Planta silvestre con potencial alimenticio 300

37TCA - Efecto de la molienda abrasiva sobre la composición y el rendimiento de los granos de quinoa. 307

38TCA - Efecto del glicerol en la formación de nanoemulsiones estabilizadas por saponina quillaja y Tween 80 315

39TCA - Efecto del procesamiento térmico sobre las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de Goma Brea 322

40TCA - Evaluación del desempeño de proteínas y mezclas proteicas vegetales comerciales, en formulaciones de baños o coberturas y su aplicación práctica en productos horneados dulces para el reemplazo de albúmina de huevo. 335

42TCA - Pigmentos antocianos de frambuesa encapsulados por liofilización y secado spray y su aplicación en polvos para preparar bebidas analcohólicas. 343

41TCA - Inclusión de nanopartículas de plata en soportes de quitosano……...……..355

01TCA - Estrategias tecnológicas para obtener yogur alto en proteínas. Influencia sobre parámetros fisicoquímicos y de textura.
Technological strategies for the production of high-protein yogurt. Effects on physicochemical and texture parameters.

M. Victoria Beret[1], Claudia I. Vénica[1,2], Silvina Rebechi[1,2], M. Soledad Caballero[1], Leila Pozza[1], M. Laura Spotti[3], Juan P. Quintero[3], I. Verónica Wolf[1,2], M. Cristina Perotti[1,2]

1. Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET). Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina.
2. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (FIQ-UNL). Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina.
3. Instituto de Tecnología de los Alimentos (FIQ-UNL). 1° de Mayo 3250, Santa Fe, Argentina.mvb2321@gmail.com

Resumen

Se elaboraron yogures altos en proteínas utilizando leche concentrada por ultrafiltración como único componente o en combinación con polvos lácteos (concentrados de proteína de suero al 35 y 80% y leche en polvo descremada) para la formulación de la leche base. Se monitoreó el pH y formación del gel durante la fermentación. La acidez, la composición global y la capacidad de retención de agua fueron evaluadas a los 21 días de almacenamiento. Además, se obtuvieron micrografías por microscopía confocal de barrido para caracterizar la microestructura y se analizó el perfil de textura por compresión de los productos al final del almacenamiento. Los yogures obtenidos alcanzaron niveles de proteína entre 6,6 y 8,3% y entre 15,4 y 17,5% de sólidos totales. Los tiempos de coagulación fueron variables según las distintas composiciones (entre 126 y 210 min), al igual que los tiempos de fermentación (270-300 min). Las características del gel durante la fermentación se correlacionaron con los parámetros de textura a los 21 días, que también difirieron según las distintas composiciones de los yogures. Las micrografías permitieron detectar la distribución de los agregados de proteínas formados según cada formulación.

Palabras clave: Yogur alta proteína, formación del gel, textura, microestructura

Abstract

High protein yogurts were made using milk concentrated by ultrafiltration, as the only component, or in combination with dairy powders (35 and 80% whey protein concentrates and skim milk powder), for the base milk formulation. pH and gel formation were monitored during fermentation. Acidification, global composition and water holding capacity were evaluated after 21 days of storage. In addition, scanning confocal microscopy micrographs were obtained to characterize the microstructure of the yogurts and the texture profile by compression was analized on the final products. Yogurts reached protein levels between 6.6 and 8.3% and between 15.4 and 17.5% of total solids. The coagulation times were variable according to the different formulations (between 126 and 210 min), as well as the fermentation times (270-300 min). The characteristics of the gel during fermentation were well correlated with the texture parameters of yogurts at 21 days, which also differed according to the different formulations of milk base employed for the yogurt making. The micrographs allowed to detect the distribution of the protein aggregates formed according to each formulation.

High protein yogurt, gel formation, texture, microstructure.

1. Introducción

El yogur es uno de los productos lácteos fermentados más comúnmente consumidos a nivel mundial (Brodziak *et al*., 2020). Es un alimento muy nutritivo ya que contiene proteínas de alto valor biológico, minerales (Ca, P) y otros importantes nutrientes (Jin *et al*., 2016). Típicamente, la elaboración de yogur involucra la fortificación de la leche base para aumentar el contenido proteico y de sólidos totales, y para mejorar las características sensoriales del producto (Moghaddas *et al*., 2018). Para tal fin, se puede fortificar la leche con ingredientes lácteos (leche en polvo, concentrados o hidrolizados de proteínas lácteas), y no lácteos (polisacáridos, etc.), o concentrar la leche por evaporación o procesos de membranas (Chandan, 2017). Particularmente, la ultrafiltración (UF) es una de las tecnologías de membranas más utilizadas en la industria. La estrategia empleada para fortificar la leche afecta la composición, en cuanto al contenido de lactosa, principal sustrato de la fermentación láctica, y de los otros macro y microcomponentes, y por lo tanto en el proceso de fermentación (formación del gel/coágulo, pH de gelificación y cinética de acidificación), lo que finalmente impactará en las características de textura y flavor del producto obtenido (Chandan, 2017; Oliveira *et al*., 2001). También influirán en las características del producto final el tratamiento térmico aplicado a la leche base o mezcla de partida, la homogeneización, la temperatura/tiempo de incubación, el tipo y propiedades del starter, la velocidad de acidificación, condiciones de almacenamiento, entre otros (Heck *et al*., 2021). Específicamente, la textura es uno de los atributos más importantes que influyen en la calidad y aceptación por parte del consumidor. La consistencia cremosa y suave y la ausencia de sinéresis son atributos muy apreciados (Delikanli y Ozcan, 2017).

En las últimas décadas han cobrado especial interés los lácteos incrementados en proteínas como por ej. el yogur estilo Griego (7-10% proteínas y 0,2-5% grasa) y las bebidas fortificadas con proteínas, en consonancia con las nuevas tendencias del mercado (Chandan, 2017). Estos productos se caracterizan por tener mayor firmeza, viscosidad y G' (módulo elástico o de almacenamiento) dado que hay mayor cantidad de proteínas participando en la formación de la red tridimensional del gel. Además, son beneficiosos desde el punto de vista nutricional debido a la capacidad de las proteínas lácteas de aumentar la cantidad y variedad de aminoácidos plasmáticos y de desencadenar la síntesis de proteínas musculares (Jorgensen *et al*., 2019). Asimismo, la ingestión de proteínas en la dieta tiene un mayor efecto sobre la saciedad que la obtenida a partir de grasas o carbohidratos (Benelam, 2009).

Jørgensen *et al*. (2015) estudiaron los efectos de la desnaturalización de las proteínas de suero, mediante distintos tratamientos térmicos, y de la relación proteínas de suero/caseína en la estructura, propiedades reológicas y sensoriales en yogures con alto contenido proteico (~8%) y bajos niveles de grasa (~0,3%), formulados a partir de un concentrado de caseína (obtenido por microfiltración) y proteínas de suero nativas. Mediante la combinación de relaciones proteínas de suero/ caseína, bajas o intermedias, y un tratamiento suave (75°C-5min) obtuvieron yogures con menor firmeza, menor G' y con mejores características sensoriales. Por otra parte, Puvanenthiran *et al*. (2002) analizaron la evolución del módulo G' durante la fermentación de yogures (aprox. 4,2% de proteínas), elaborados con leche en polvo descremada y concentrados de proteínas de suero en polvo (25, 40, 51, 63 y 80% de proteína), de manera de tener distintas relaciones de caseínas/proteínas de suero, y manteniendo los sólidos totales entre 9 y 15%. Se observó que al disminuir la relación caseínas/proteínas de suero la fuerza del gel formado fue mayor, la sinéresis se redujo y los yogures fueron menos viscosos. Además, los geles con menores proporciones de caseínas mostraron una microestructura más fina, con numerosos poros pequeños y una red más entrecruzada y densa. Narayana y Gupta (2018) informaron mayor capacidad de retención de agua, un aumento en los niveles de acetaldehído (compuesto característico del volatiloma de yogur) y una textura mejorada en yogur (1,5% de grasa y 4,6% proteínas) elaborado con retentado de UF, y no se observó efecto sobre la carga microbiana. Magenis *et al.* (2006) estudiaron las propiedades de flujo, el perfil de textura y la sinéresis en yogures descremados (0,5% materia grasa) y con 3,3 - 3,5% de proteína formulados completamente con leche concentrada por UF y con la combinación de suero de queso concentrado UF y leche concentrada por UF (80:20, respectivamente). Los productos que tenían concentrado de suero mostraron menor viscosidad aparente, mayor tixotropía, menor firmeza, menor adhesividad, mayor cohesividad y mayor índice de sinéresis que los elaborados solamente con leche concentrada.

Particularmente, estudios que evalúen el seguimiento de la formación del gel durante la fermentación de yogures mediante la medición del módulo de almacenamiento y de pérdida (G' y G''), y el efecto de diferentes ingredientes y tecnologías son abundantes (Haque *et al*., 2001; Puvanenthiran *et al*., 2002; Peng *et al*., 2009). Sin embargo, esta caracterización en yogures altos en proteínas y a través de mediciones no reométricas es escasa (Serra *et al*., 2007).

El objetivo de este trabajo fue estudiar diversas estrategias para incrementar el contenido proteico en

yogur y analizar su efecto en la formación del gel/coágulo durante la fermentación y en las características fisicoquímicas, de textura y microestructura de los productos.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Los ingredientes: leche concentrada por ultrafiltración y su respectivo permeado (MC, 8,5% p/v proteínas y MP, 0,1% p/v proteínas), crema de leche (C, 46% p/v grasa), leche en polvo descremada (SMP) y concentrados de proteínas de suero al 35 y 80% (WPC35 y WPC80, respectivamente), fueron provistos por Milkaut S.A. (Franck, Argentina). La pectina fue suministrada por Saporiti S. A. (Buenos Aires, Argentina). El fermento clásico de yogur (YF-L811), compuesto por *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* fue provisto porHansen (Buenos Aires, Argentina).

2.2. Elaboración de los yogures

Se prepararon 4 bases lácteas distintas con los ingredientes mencionados en diferentes proporciones para conseguir yogures con 6-8% p/v de proteínas y aprox. 1,5% p/v de grasa; en todos los casos se adicionó pectina (0,15% p/v).

Se elaboraron 4 tipos de yogures: Y1 (MC+C), Y2 (MC+WPC80+C), Y3 (MC+WPC35+C) y Y4 (MC+WPC80+SMP+C), a escala laboratorio (500 mL). Se utilizó un protocolo estandarizado para yogur tipo batido (Vénica *et al*., 2019) que consistió en hidratar los ingredientes en condiciones de refrigeración, homogeneización, tratamiento térmico (85°C/ 30 min.), enfriamiento a la temperatura de fermentación, inoculación con el fermento e incubación a 42°C en baño termostatizado hasta alcanzar el pH final (4,75±0,05), enfriamiento a 18-20°C y almacenamiento a 5°C por 21 días. Se midió la acidez titulable (AT) y el pH de las leches base, y el seguimiento de la fermentación se realizó con mediciones de pH. Simultáneamente, se evaluó el proceso de gelificación/coagulación durante la fermentación por IR cercano, según lo detallado a continuación. A los yogures con 21 días, se les evaluó la acidez (pH y AT), la capacidad de retención de agua (CRA) y la composición global, y se analizó el perfil de textura y la microestructura. Las elaboraciones se ensayaron por triplicado.

2.3. Evaluación de las propiedades de gelificación/coagulación

Se analizó la evolución de la formación del gel o coágulo durante la fermentación empleando un equipo Optigraph® (Alliance, Francia). El método se basa en la medición de la atenuación de la señal óptica en el IR cercano durante el proceso fermentativo. El equipo está provisto por 10 cubetas, en las que se colocaron las leches bases (10 mL), por duplicado, inmediatamente después de la inoculación con el fermento. La temperatura se configuró en 42±2°C y el tiempo total de monitoreo fue de 5 h.

A partir de las curvas de coagulación (%intensidad de luz emitida vs tiempo) se obtuvieron cuatro parámetros: TC, tiempo correspondiente al comienzo de la coagulación (min), dado por el máximo de la primera derivada de la curva; F_f, firmeza final del gel (Volts); DG, índice de densidad del gel al final de la coagulación (% intensidad de luz emitida),calculado como la diferencia entre la firmeza final y la firmeza inicial (F_i), y VA, velocidad de agregación (% intensidad de luz emitida/min) representada por la pendiente de la región lineal de la curva (Serra *et al*., 2007).

2.4. Análisis fisicoquímicos

Se midió el pH con pHmetro digital (Orion 3 star benchtop, Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU) (Bradley *et al*., 1992). La acidez titulable (AT) fue determinada por titulación con solución de NaOH N/9, expresándose los resultados en grados Dornic (1 ºD = 1 mg ácido láctico/10 mL leche) (International Dairy Federation, IDF 150:2012). La determinación de los contenidos de proteínas, sólidos totales y materia grasa se llevaron a cabo por métodos normalizados (International Dairy Federation, IDF 020-1/2:2001,IDF 151:2005,IDF 1D:1996, respectivamente). También se determinó la capacidad de retención de agua (CRA) del gel de yogur por pesada del suero liberado luego de la centrifugación de la muestra en condiciones estandarizadas (20 °C/5000 g/10 min) (Akalin *et al*., 2012). Los análisis se realizaron por duplicado.

2.5. Análisis de perfil de textura por compresión

El ensayo de perfil de textura se realizó de acuerdo a lo descripto en Casa-Aléncaster y Pardo-García (2005) en una máquina universal de ensayos INSTRON Modelo 3344 (Instron, EEUU) realizando dos ciclos de compresión a un nivel de deformación del 30%. La muestra de yogur (35 mm de diámetro y 30 mm de altura) se estabilizó previamente a 10 °C por 30 min. Se utilizó una fuerza de contacto de 0,05 N, a una velocidad de 1 mm/s y un tiempo de espera entre el primer y el segundo ciclo de 5 s.

A partir de la curva fuerza-tiempo se obtuvieron los siguientes parámetros: **dureza**, fuerza máxima en el primer ciclo de compresión; **índice de recuperación**

elástica instantánea (IREI), cociente de la distancia recuperada por la muestra durante la descompresión del primer ciclo sobre la distancia comprimida; **índice de recuperación elástica retardada** (IRER), cociente de la distancia recuperada por la muestra entre el término de la compresión del primer ciclo y el inicio de la compresión del segundo ciclo sobre el área positiva del primer ciclo; **masticabilidad**, producto de la dureza, la cohesividad y IRER; **cohesividad**, relación del área positiva del segundo ciclo de compresión sobre el área positiva del primer ciclo; **resiliencia,** relación entre el área de descompresión y el área de compresión del primer pico, **y adhesividad**, área negativa luego del primer ciclo de compresión. Los ensayos se realizaron por duplicado.

2.6. Microestructura

La microestructura de los yogures fue estudiada mediante microscopía confocal de barrido, con un microscopio tipo confocal invertido con sistema de detección espectral SP de alta sensibilidad (Leica, modelo TCS SP8, Alemania). Se empleó rodamina B como fluoróforo para la tinción de las proteínas. La longitud de onda de excitación fue de 568 nm.

2.7. Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA de una vía con un nivel de significancia p<0,05. La comparación de medias fue realizada mediante test de Tukey, con un nivel de confianza del 95%. Se empleó el software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc., EEUU).

3. Resultados y Discusión

3.1. Evolución de la fermentación y seguimiento de la coagulación

El pH y la AT de las leches base se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. pH y AT de leches bases

	pH	AT (°D)
Y1	6,66±0,05^{a,b}	22,17±0,93^{a,b}
Y2	6,72±0,01^{a}	21,79±1,36^{b}
Y3	6,59±0,05^{b}	25,00±0,80^{a}
Y4	6,69±0,04^{a}	23,91±2,08^{a,b}

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas

El pH de la formulación Y3 fue menor (p<0,05) respecto a Y2 y Y4, aunque no se observaron diferencias (p>0,05) con Y1; estos resultados se correlacionaron con mayores valores (p<0,05) de AT en Y3 respecto a Y2.

El pH target (4,70-4,80) fue alcanzado entre 270 y 300 minutos de incubación a 42°C. En general, las fermentaciones Y1 y Y3 fueron más lentas que las restantes (Figura 1). Y3 mantuvo el mayor nivel de pH hasta los 180 min respecto al resto, seguido por Y1, y ambos superando a Y2 y Y4 (p<0,05). A los 240 min Y1~Y3>Y2>Y4 (p<0,05). A los 270 min concluyó la fermentación de Y2 y Y4, mientras que Y1 y Y3 demoraron 300 minutos en alcanzar el pH final. Se ha reportado que formulaciones con elevado contenido proteico tienen mayor capacidad buffer, lo que se traduce en un mayor tiempo de fermentación (Jorgensen *et al*., 2019). En efecto, Jorgensen *et al*. (2015) observaron diferencias en los

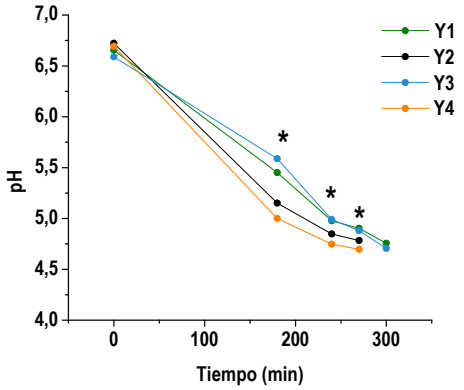


Figura 1. Evolución del pH durante la fermentación. (*) indica diferencia significativa (p<0,05).

tiempos de fermentación de yogures altos en proteína (~8%) con distintos contenidos y relaciones caseínas/proteínas de suero: los mayores tiempos de fermentación se dieron en aquellas formulaciones que no tenían proteínas de suero adicionadas, con una relación caseínas/proteínas de suero de 90:10. También detectaron que a menor relación caseínas/proteínas de suero los tiempos de fermentación fueron menores, con una diferencia de 100 minutos entre yogures con 90:10 respecto a otros con relación 55:45. Estas diferencias se atribuyeron a la capacidad buffer, aminoácidos liberados y otros compuestos solubles presentes (fosfato de calcio y citrato).

En la Figura 2 se muestra una curva típica obtenida durante la formación del gel de yogur en el equipo Optigraph. Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 2. El yogur Y1 requirió un tiempo mayor (p<0,05) que el resto de los yogures para comenzar a

Tabla 2. Parámetros de coagulación

	Y1	Y2	Y3	Y4
TC (min)	210,13±8,52^{a}	126,55±5,66^{b}	128,25±0,42^{b}	127,10±2,75^{b}
F_f(V)	29,79±1,11^{a}	18,24±1,21^{b}	6,53±0,65^{c}	8,62±0,28^{c}
DG (%intensidad)	79,57±5,44^{a}	37,51±2,38^{b}	13,40±1,63^{c}	15,70±0,94^{c}
VA (%intensidad/ min)	0,06±0,02^{c}	0,30±0,12^{b}	ND	1,15±0,04^{a}

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas

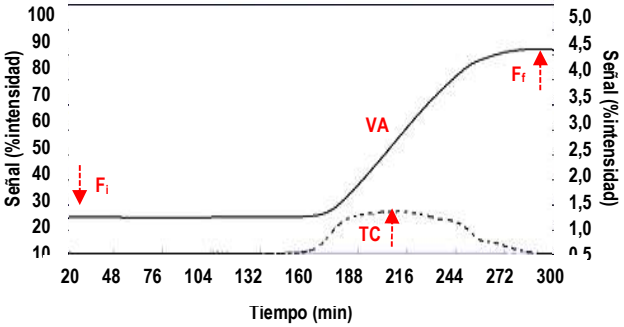


Figura 2. Curva típica señal vs tiempo durante la coagulación del yogur (Serra et al., 2007).

coagular/gelificar, en coincidencia con el mayor tiempo de fermentación respecto a los yogures Y2 y Y4. Puvanenthiran *et al*. (2002) también observaron un retardo en el comienzo de la coagulación a través de medidas reológicas en aquellos yogures que más tiempo demoraron en alcanzar el pH final, los que se formularon manteniendo constante la concentración de proteína (4,18%) y con distintas relaciones caseínas/proteínas de suero.

La firmeza de los yogures fue variable y se correlacionó con la densidad del gel: Y1>Y2>Y3~Y4. Si bien el índice de densidad del gel da idea de la interacción entre las partículas y la densidad de la red formada, no representa exactamente la textura del yogur. Además, a la temperatura de la realización de la medición (42°C) la materia grasa se encuentra en estado líquido. Asimismo, el volumen y forma de las micelas de caseína se ven afectados al disminuir la temperatura. Ambos factores influyen en la textura del producto (Serra *et al*., 2007). La mayor velocidad de agregación se dio en Y4 y la menor en Y1 ($p<0,05$), niveles intermedios se observaron en Y2. Para Y3 no se pudo calcular este parámetro, ya que la pendiente de la curva fue muy suave, lo que podría asociarse a una muy baja velocidad de agregación. Estos resultados coincidieron con los tiempos de fermentación observados.

3.2. Parámetros fisicoquímicos de los yogures

La composición global de los yogures se muestra en la Tabla 3. Los contenidos de proteínas fueron similares entre Y1 y Y2 y mayores que en Y3 y Y4 ($p<0,05$). Los niveles de materia grasa fueron equivalentes en todas las muestras ($p>0,05$). Por otra parte, los sólidos totales fueron significativamente mayores en Y3 que en el resto de los yogures ($p<0,05$). Las diferencias encontradas en este último parámetro podrían ser atribuidas a diferentes niveles de lactosa incorporada a través de los ingredientes en polvo.

Tabla 3. Composición global

	Proteína (%)	Grasa (%)	Sólidos totales (%)
Y1	8,30±0,11^{a}	1,46±0,12^{a}	15,42±0,64^{b}
Y2	8,44±0,08^{a}	1,26±0,09^{a}	15,40±0,40^{b}
Y3	7,96±0,07^{b}	1,34±0,04^{a}	17,55±0,35^{a}
Y4	6,64±0,16^{c}	1,39±0,08^{a}	15,61±0,24^{b}

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas

Los valores de pH y CRA (Tabla 4) no mostraron diferencias significativas entre las muestras ($p>0,05$), mientras que la AT fue mayor en Y1 y Y3 y menor en Y2 ($p<0,05$). La acidez titulable estuvo dentro del rango establecido por la Legislación Argentina (CAA 2019). Los valores de estos tres parámetros fueron similares a los reportados por Vénica *et al*. (2020) para yogures con contenidos proteicos entre 4,13 y 5,54% y bajos en grasa (~1,5%), formulados con la incorporación de distintos ingredientes lácteos (SMP, WPC40, WPC80, hidrolizado y aislado de proteínas de suero y suero desmineralizado) tras 21 días de almacenamiento. Particularmente, Narayana y Gupta (2016) hallaron valores similares de CRA a los de este trabajo, para yogures elaborados con leche concentrada por UF (factor de concentración, 1,5), con ~5,3% de proteínas; asimismo, estos resultados superaron a los obtenidos para yogures formulados con leche sin concentrar.

Tabla 4. pH, acidez y CRA

	pH	AT (°D)	CRA (%)
Y1	4,37±0,06^{a}	150,25±4,10^{a}	57,56±2,03^{a}
Y2	4,36±0,06^{a}	128,10±8,65^{b}	59,32±2,35^{a}
Y3	4,45±0,08^{a}	148,57±9,35^{a}	56,25±3,87^{a}
Y4	4,35±0,04^{a}	134,30±5,50^{a,b}	56,43±1,94^{a}

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas

3.3. Perfil de textura

En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis de perfil de textura de los yogures y en la Tabla 5 los valores medios correspondientes a cada parámetro estudiado.

El yogur Y1 presentó la mayor dureza seguido por Y2, encontrándose diferencias significativas entre ambos ($p<0,05$). Estas dos formulaciones se diferenciaron de Y3 y Y4, que presentaron una dureza similar ($p>0,05$) y significativamente más baja que Y1 (más del 50%) y Y2 (un 40% aprox.). Otros parámetros en los cuales se encontraron diferencias significativas fueron la masticabilidad y la adhesividad. El primero es directamente proporcional a la dureza, por lo tanto, la masticabilidad fue mayor en los yogures Y1 y Y2, y menor en Y3 y Y4 en consonancia con la firmeza obtenida. En cuanto a la adhesividad, Y1 y Y2 mostraron valores significativamente mayores respecto a los otros dos yogures ($p<0,05$).

Luego de la deformación aplicada en el ensayo, los yogures exhibieron un alto índice de recuperación elástica instantánea (IREI), que es prácticamente igual al índice de recuperación elástica retardada (IRER), lo que indica que los yogures presentaron alta elasticidad, se recuperaron fácilmente luego del esfuerzo aplicado y no sufrieron deformación permanente en las condiciones del ensayo. No se encontraron diferencias significativas en la

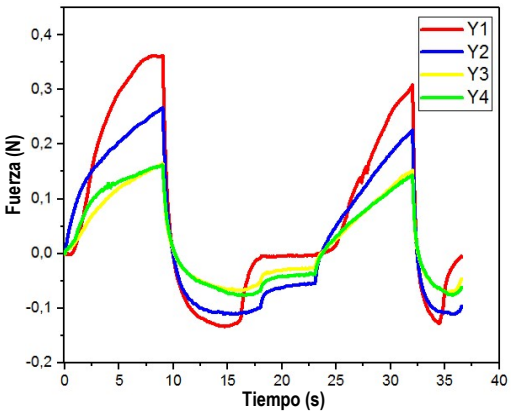


Figura 3. Curvas de análisis de perfil de textura por compresión.

cohesividad para las cuatro formulaciones y lo

mismo para la resiliencia, que tuvo valores bajos para todas las muestras.

La dureza es uno de los parámetros más importantes para medir la textura del yogur. Se define como la fuerza necesaria para lograr una determinada deformación (Mugdil *et al*., 2017), la cual depende del contenido de sólidos totales, de la concentración y del tipo de proteínas que contenga, entre otros factores (Magenis *et al*., 2006). La adhesividad se considera la fuerza necesaria para eliminar el material adherido en la boca al comer. Se considera como una medida de la pegajosidad del yogur. La cohesividad es el nivel al que un material puede deformarse antes de que se rompa y es una medida de la fuerza de los enlaces internos (Mugdil *et al*., 2017). Oliveira *et al*. (2001) hallaron diferencias en la firmeza en leches fermentadas con alto contenido proteico (6,5%, 11,9% y 17,2%) y cantidades estandarizadas de sólidos totales (15,5%), cuyas composiciones difirieron en la fortificación de la leche base con distintos ingredientes en polvo (suero, hidrolizado de caseína y concentrado de proteínas de leche). La firmeza fue mayor en la formulación con mayor contenido de proteínas que provenía del concentrado de proteínas de leche, y la menor firmeza se observó en el yogur fortificado con suero en polvo. Delikanli y Ozcan (2017) observaron diferencias entre los parámetros de textura en yogures con distintos ingredientes lácteos (caseinato de sodio, caseinato de calcio y concentrado de proteínas de leche) y niveles de proteínas entre 4,6 y 5%. En general, la adición de caseinatos (y el consecuente aumento de la relación caseínas/proteínas de suero) y concentrado de proteínas de leche causó mayor dureza y adhesividad en comparación a un yogur sin fortificación. Además, Narayana y Gupta (2016) observaron diferencias en los valores para todos los parámetros

Tabla 5. Parámetros del perfil de textura

	Y1	Y2	Y3	Y4
Dureza (N)	0,34±0,05^{c}	0,25±0,02^{b}	0,16±0,03^{a}	0,15±0,02^{a}
IREI	0,27±0,02^{a}	0,30±0,05^{b,a}	0,37±0,03^{c}	0,34±0,02^{c,b}
IRER	0,40±0,01^{a}	0,39±0,02^{a}	0,39±0,01^{a}	0,39±0,01^{a}
Cohesividad	0,59±0,02^{a}	0,59±0,07^{a}	0,63±0,05^{a}	0,65±0,05^{a}
Resiliencia	0,06±0,01^{a}	0,06±0,01^{a}	0,07±0,02^{a}	0,08±0,02^{a}
Masticabilidad (N)	0,08±0,01^{b}	0,06±0,01^{a}	0,04±0,01^{a}	0,04±0,01^{a}
Adhesividad (J)	0,79±0,15^{b}	0,70±0,11^{b}	0,42±0,12^{a}	0,37±0,07^{a}

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas

del perfil de textura, en yogures elaborados con leche concentrada por UF, siendo mayor la firmeza y la adhesividad a mayor factor de concentración.

Es importante destacar que los valores de firmeza y densidad del gel determinados con el equipo Optigraph al final de la fermentación (Tabla 2) coincidieron con la dureza de los yogures a los 21 días. El seguimiento de la formación del gel de yogur por medidas ópticas mediante el equipo Optigraph y la posterior caracterización del perfil de textura del producto final no han sido previamente reportados.

3.4. Microestructura

Las imágenes de microscopía confocal muestran los agregados proteicos (color rojo) formados en los yogures (Figura 4). Se pueden distinguir agregados de diferente tamaño en todos los casos. En Y3 y Y4

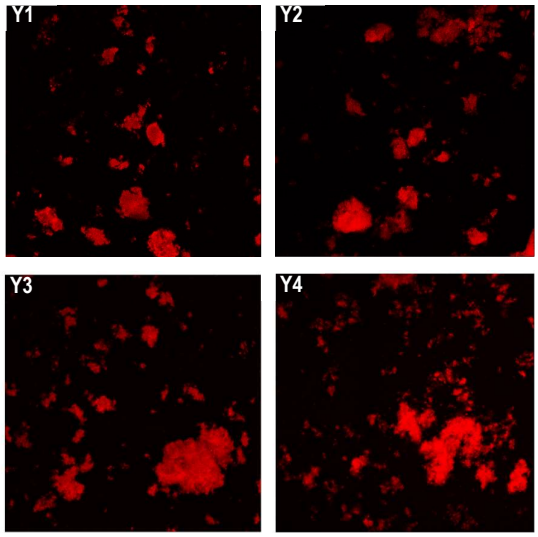


Figura 4. Micrografías de los yogures.

se puede observar mayor densidad de agregados de menor tamaño que en Y1 y Y2, que presentan agregados más grandes y se encuentran más dispersos. De manera similar, Jørgensen *et al*. (2015) detectaron grandes agregados proteicos y poros de gran tamaño en yogures (~8% proteínas) formulados con concentrados de caseínas. Los yogures tipo batido presentan grandes agrupaciones de caseínas, originadas por la colisión y el esfuerzo que ocurre durante el mezclado. La red tridimensional del gel que podría observarse en un yogur tipo firme desaparece en el batido. En efecto, el yogur batido se caracteriza por una red débil, siendo difícil encontrar partículas individuales ya que se asocian formando clusters de proteínas para formar la red del gel (Lee y Lucey, 2010).

4. Conclusiones

La utilización de leche concentrada por UF y la fortificación con ingredientes en polvo permitió obtener yogures incrementados en contenido proteico y descremados, con características fisicoquímicas adecuadas. Las características evaluadas durante la formación del gel mostraron una buena correlación con los parámetros observados en el análisis de textura del producto final. La microestructura de los yogures permitió diferenciar distintos tamaños de agregados proteicos según las distintas composiciones de los yogures, lo que impactó en la textura del producto final.

5. Referencias

Akalin, A. S.; Unal, G.; Dinkci, N.; Hayaloglu, A. A. (2012). *Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate*. Journal of Dairy Science, 95(7), 3617–3628.

Benelam, B. (2009). *Satiation, satiety and their effects on eating behaviour*. In Nutrition Bulletin (Vol. 34, Issue 4, pp. 412–416).

Bradley, R.; Arnold, E.; Barbano, D.; Semerad, R.; Smith, D.; Vines, B. (1992) *Chemical and physical methods*. In: Marshall RT (ed) Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association (APHA), Washington, USA.

Bradley, R. L.; Arnold, E.; Barbano, D. M.; Semerad, R. G.; Smith, D. E.; Vines, B. (1993). *Chemical and physical methods*. In R. Marshall (Ed.), Standard Methods for the Examination of Dairy Product (pp. 433–531). American Public Health Association.

Brodziak, A.; Król, J.; Barłowska, J.; Teter, A.; Florek, M. (2020). *Changes in the Physicochemical Parameters of Yoghurts with Added Whey Protein in Relation to the Starter Bacteria Strains and Storage Time*. Animals, 10(8), 1350.

Casas-Alencáster, N. B.; Pardo-García, D. G. (2005). *Análisis de perfil de textura y propiedades de relajación de geles de mezclas almidón de maíz ceroso entrecruzado-gelana*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 4(1), 107–121.

Chandan, R. C. (2017). *An overview of yogurt production and composition*. In Yogurt in Health and Disease Prevention. Elsevier Inc.

Código Alimentario Argentino (ANMAT). Capítulo VII: alimentos lácteos.

Delikanli, B.; Ozcan, T. (2017). *Improving the Textural Properties of Yogurt Fortified with Milk Proteins*. Journal of Food Processing and Preservation, 41(5).

Haque, A.; Richardson, R. K..; Morris, E. R. (2001). *Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt*. Food Hydrocolloids, 15(4–6), 593–602.

Heck, A.J.; Schafer, J.; Nobel, S.; Hinrichs, J. (2021*) Fat-free fermented concentrated milk products as milk protein-based microgel dispersions: Particle characteristics as key drivers of textural properties*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1-32.

IDF 020-1/2:2001 - Milk - Determination of nitrogen content - Part 1/2: Determination of nitrogen content using the Kjeldahl method.

IDF 150:2012. Fermented milks - Determination of titratable acidity - Potenciometric method

IDF 151:2005. Yogurt – Determination of total solid content (Reference method).

IDF-FIL, 1996. International Standard 1D. Determination of Fat Content-Gravimetric Method (Rose-Gottlieb Reference Method).

Jin, Y.; Yu, Y.; Qi, Y.; Wang, F.; Yan, J.; Zou, H. (2016). *Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion*. Journal of Proteomics, 141, 24–46.

Jørgensen, C. E.; Abrahamsen, R. K.; Rukke, E. O.; Hoffmann, T. K..; Johansen, A. G.; Skeie, S. B.

(2019). *Processing of high-protein yoghurt – A review*. International Dairy Journal, 88, 42–59.

Jørgensen, C. E.; Abrahamsen, R. K.; Rukke, E. O.; Johansen, A. G.; Schüller, R. B.; Skeie, S. B. (2015*). Improving the structure and rheology of high protein, low fat yoghurt with undenatured whey proteins*. International Dairy Journal, 47, 6–18.

Lee, W. J.; Lucey, J. A. (2010). *Formation and physical properties of Yogurt*. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 23(9), 1127–1136.

Magenis, R. B.; Prudêncio, E. S.; Amboni, R. D. M. C.; Cerqueira, N. G.; Oliveira, R. V. B.; Soldi, V.; Benedet, H. D. (2006). *Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration*. International Journal of Food Science and Technology, 41(5), 560–568.

Moghaddas Kia, E.; Ghasempour, Z.; Ghanbari, S.; Pirmohammadi, R.; Ehsani, A. (2018). *Development of probiotic yogurt by incorporation of milk protein concentrate (MPC) and microencapsulated* Lactobacillus paracasei *in gellan-caseinate mixture*. British Food Journal, 120(7), 1516–1528.

Mudgil, D.; Barak, S.; Khatkar, B. S. (2017). *Texture profile analysis of yogurt as influenced by partially hydrolyzed guar gum and process variables*. Journal of Food Science and Technology, 54(12), 3810–3817.

Narayana N.; Gupta V. (2018). Storage *Changes and shelf Life Of Strawberry Set Yogurt Made By Milk Standardized Using Ultrafiltered Skim Milk Retentate.*International Journal of Scientific & Technology Research 7 (8), 261-268.

Narayana, N. M. N. K.; Gupta, V. K. (2016). *Quality of Plain Set Yoghurt as affected by Levels of Ultrafiltration Concentration of Milk and Inoculum of Yoghurt Culture*. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 4(6), 508-514.

Oliveira, M. N.; Sodini, I.; Remeuf, F.; Corrieu, G. (2001). *Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria*. International Dairy Journal, 11(11–12), 935–942.

Peng, Y.; Serra, M.; Horne, D. S.; Lucey, J. A. (2009). *Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt*. Journal of Food Science, 74(9).

Puvanenthiran, A.; Williams, R. P. W.; Augustin, M. A. (2002). *Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios*. International Dairy Journal, 12(4), 383–391.

Serra, M.; Trujillo, A. J.; Quevedo, J. M.; Guamis, B.; Ferragut, V. (2007). *Acid coagulationproperties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation*. International Dairy Journal, 17(7), 782–790.

Vénica, C I,; Bergamini, C. V.; Capra, M. L.; Binetti, A.; Perotti, M. C. (2019). *Desarrollo de un yogur incrementado en proteínas, efecto de la composición de la matriz láctea en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y perfiles de fermentación*. Tecnología Láctea Latinoamericana, 109, 44–49.

Vénica, C. I.; Spotti, M. J.; Pavón, Y. L.; Molli, J. S.; Perotti, M. C. (2020). *Influence of carrot fibre powder addition on rheological, microstructure and sensory characteristics of stirred-type yogurt*. International Journal of Food Science and Technology, 55(5), 1916–1923.

02TCA - Estudio computacional del efecto del pH y la concentración de sal en el potencial electrostático de α-lactoalbumina.

Computational study of the pH and salt concentration on the electrostatic potential of α-lactalbumin

Paola B. Torres[1], Pablo M. Blanco[2], Josep L. Garcés[3], Claudio Narambuena[1].

1. Grupo Bionanotecnología y sistemas complejos. CONICET-UTN-UNSL & Facultad Regional San Rafael, Universidad Tecnológica Nacional
2. Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Czech Republic.
3. Department of Chemistry, University of Lleida, Catalonia, Spain.
   paotorres89@gmail.com

Resumen

En el presente trabajo se estudió el perfil del potencial electrostático de la proteína α-lactoalbúmina utilizando simulaciones de Monte Carlo. La proteína fue estudiada en el rango de pH entre 2 y 7 a tres concentraciones de sal 1 mM, 10 mM y 100 mM. Se encontró que a medida que la concentración de sal aumenta la carga neta de la proteína se acerca a la curva ideal y el punto isoeléctrico es estimado en alrededor de pI=4.9. La concentración radial de iones pequeños mostró que la concentración de aniones presenta un máximo a una distancia de 2 nm en las tres concentraciones de sal estudiadas a pH =3, luego, en los tres casos, a medida que aumenta la distancia la concentración se igualó a la concentración en el seno de la solución. El estudio del potencial electrostático mostró que la proteína presenta un potencial electrostático asimétrico en el plano XY debido a la distribución de cargas asimétricas, la cual depende de la estructura intrínseca de la proteína y del estado de ionización de los grupos titulables. Además, se encontró que al aumentar la concentración de sal se produce una disminución en el potencial electrostático promedio.

Palabras clave: simulación, proteína, Monte Carlo.

Abstract

In the present work, we studied the electrostatic potential profile for the α-lactalbumin with Monte-Carlo simulation. The protein was studied in the pH range from 2 to 7 at three salt concentrations 1 mM, 10 mM and 100 mM. It was observed that as the salt concentration increased the net charge of the protein increases and the isoelectric point was estimated in pI=4.9. The radial concentration of small ions showed that the anions concentration had a maximum at a distance 2 nm (from the center of mass of the protein) at the three salt concentrations values studied at pH =3.0. Then, as the distance increased the concentration matched the bulk concentration of the solution. The electrostatic potential showed that the protein had an asymmetric behavior on the XY plane due to the asymmetric distribution of the charge which depend on the intrinsic structured of the protein and the ionization of the titratable groups. Moreover, the increase on the salt concentration reduces the average electrostatic potential.

Keywords: simulation, protein, Monte Carlo

1. Introducción

El suero lácteo es el subproducto obtenido durante la elaboración del queso tras la separación del coágulo lácteo formado por la gelificación de las caseínas. Este subproducto representa alrededor del 85 – 95% del volumen de la leche y retiene el 55% de los nutrientes de la misma. Las proteínas del suero lácteo (PSL) constituyen el 0.7 % P/V de los nutrientes del suero lácteo y representan el 20% de las proteínas totales de la leche, siendo sus principales componentes β-lactoglobulina, α-lactoalbúmina y glicomacropéptido. Por lo tanto, resulta de interés comprender el comportamiento a nivel macro de las proteínas presente en el suero lácteo. En trabajos anteriores se ha realizado el estudio computacional de la β-lactoglobulina con la interacción con polielectrolitos débiles y fuertes. (P. B. Torres et al., 2017; P. B. Torres et al., 2019)

El objetivo del presente trabajo es estudiar la proteína α-lactoalbúmina a diferentes concentraciones de sal en un amplio rango de pH, para analizar cómo es afectado el potencial electrostático dentro y fuera de la proteína.

2. Materiales y métodos

La metodología para el desarrollo del presente trabajo consiste en la simulación de la proteína con el modelo de grano grueso, el cual permite una representación simplificada del sistema con mínimo número de parámetros. Se utiliza el algoritmo de metrópolis Monte Carlo en el ensamble semi-gran canónico para la simulación del sistema. (Metropolis et al., 1953; Tobochnik et al., 2013)

El modelo de grano grueso utilizado para la proteína fue construido a partir de la posición de cada átomo que la compone obtenida del Protein Data Bank (1BEB), figura 1. Cada aminoácido es representado por dos esferas, una para el carbono α y otra para la cadena lateral del residuo del aminoácido. Los carbonos α constituyen la columna vertebral de la proteína, cada uno está conectado a un residuo (Grupo R), el cual establece la naturaleza de cada aminoácido. Cada grupo R comprende un grupo de átomos y fue representado como una esfera rígida para aproximar el volumen excluido correspondiente. (P. B. Torres et al., 2017; P. B. Torres et al., 2019)

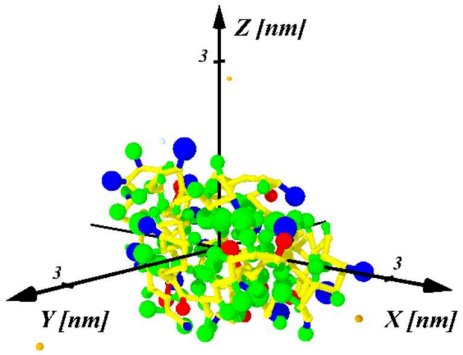


Figura 1. Modelo de grano grueso.

El algoritmo Metrópolis Monte Carlo es un método estocástico basado en movimientos al azar en un espacio coordinado, en el cual cada configuración tiene un peso estadístico definido por la distribución de Boltzmann. El centro de masa de la proteína es localizado en el origen de coordenadas del sistema, ver Figura 1.

Durante la simulación de Monte Carlo, los iones pequeños tienen la posibilidad de trasladarse en cualquier dirección con una probabilidad dada por:

$$\min\left(1, e^{-\beta \Delta U_{el}}\right) \qquad (1)$$

Donde ΔU_{el} es el cambio en la energía electrostática total y β es igual a $1/k_B T$

Mientras la carga de la proteína fluctúa de acuerdo a los siguientes movimientos en ensamble semi-canónico:

1. Un sitio titulable en la proteína es elegido al azar.
2. Si se encuentra deprotonado, se mueve la carga de la solución al sitio titulable (Proceso de protonación)
3. Si esta protonado, se mueve el protón a la solución (proceso de deprotonación).

Los movimientos son aceptados de acuerdo con la probabilidad

$$\min\left(1, e^{-\beta \Delta U_{el} \pm (pH - pK_a) ln10}\right) \qquad (2)$$

El segundo término en la exponencial tiene en cuenta el cambio de energía libre del proceso de (de)protonación para un aminoácido, no afectado por la presencia del resto de la proteína ni la sal. La magnitud de este término es determinada por el pH y la constante intrínseca pKa.

En el presente trabajo las simulaciones de Monte Carlo fueron realizadas a tres concentraciones de sal: $1\,mM$, $10\,mM$ y $100\,mM$. Se utilizo un tamaño de caja $L_{Box} = 50\,nm$ para la concentración de sal mas baja y $L_{Box} = 30\,nm$ para los otros dos valores. (Torrie & Valleau, 1980)

Concentración Radial de Iones

Para estimar la concentración radial de iones, lo primero que se realizó fue subdividir el espacio que rodea a la proteína en casquetes esféricos concéntricos al centro de masa de la proteína. Cada casquete j presenta un radio interno rad_j^{int} y un radio externo rad_j^{ext}. Considerando que $dr_i = |\vec{r_i} - \vec{r}_{cm}|$ es la distancia entre una partícula i del sistema con respecto al centro de masa de la proteína. Se estableció como condición necesaria para considerar una partícula i en un casquete j que:

$$\begin{cases} rad_j^{int} < dr_i \\ dr_i < rad_j^{ext} \end{cases} \quad (3)$$

La concentración radial fue calculada como:

$$c^k(r_j) = \frac{\langle n_j^k \rangle}{V_j} \quad (4)$$

Donde n_j^k representa el acumulado de partículas k en el casquete j y V_j representa el volumen de dicho casquete. El volumen es calculado como:

$$V_j = \frac{4}{3} * \pi * \left(rad_j^{ext}\right)^3 - \frac{4}{3} * \pi * \left(rad_j^{int}\right)^3 \quad (5)$$

Potencial Electrostático.

El potencial electrostático fue calculado utilizando la formula:

$$\psi(r) = \frac{e}{\varepsilon_0 \varepsilon_r 4\pi} \sum_{i=1}^{i=N} \frac{z_i}{r - r_i} \quad (6)$$

en la cual e representa la carga elemental,i es una partícula del sistema (proteína e iones), z_i representa la carga neta, r representa una posición aleatoria y r_i representa la posición de la partícula en el sistema. En el cálculo del potencial electrostático se considera que el centro de coordenadas ubicado en el centro de masa de la proteína.

En el presente trabajo, primero se calculó el potencial electrostático con respecto a cada uno de los ejes X, Y, y Z individualmente. Para ello, se define el vector de la posición r con respecto a solo uno de los ejes y fijando un valor de cero para los otros dos. Luego, se calcula el promedio sobre todas las configuraciones de la simulación de Monte Carlo.

En segundo lugar, se calculó el potencial electrostático con respecto al $Plano\,XY$. En este caso, la posición del vector r es una función de X e Y, mientras que Z se establece como cero. El mapeo del potencial electrostático se realiza moviendo la posición desde el eje $-X$ girando 180° hasta el eje $+X$. La variación de las posiciones se va realizando considerando un incremento de 1°. Luego se realiza un promedio sobre todas las configuraciones de la simulación.

3. Resultados y Discusión

Se estudio la proteína α-lactoalbumina mediante simulaciones de Monte Carlo a tres concentraciones de sal: 1 mM, 10 mM y 100 mM.

Primero se analizó el efecto de la sal en el comportamiento de protonación de la proteína aislada. Para ello, se realizaron simulaciones de la proteína en el rango de pH estudiado (2 a 7), teniendo en cuenta la cantidad de residuos titulables presentes en la misma.

La tabla 1 y 2 lista las cantidades (y sus pKa) de residuos ácidos y básicos respectivamente.

Tabla 1. Cantidad de grupos ácidos de la proteína y pKa intrínseco.

	Asp	***Glu***	***Cys***	***Tyr***	***Cter***
$\boldsymbol{pK_{ai}}$	4.0	4.4	9.5	9.6	3.8
$\boldsymbol{\omega_i}$	13	7	0	4	1

Tabla 2. Cantidad de grupos básicos de la proteína y pKa intrínseco.

	Arg	***His***	***Lys***	***Nter***
$\boldsymbol{pK_{ai}}$	12.0	6.3	10.4	7.5
$\boldsymbol{\omega_i}$	1	3	12	1

La figura 2 muestra la carga neta de la proteína aislada en función del pH. Los resultados de la simulación de Monte Carlo (MC) son mostrados en línea de trazo y con símbolos para tres concentraciones de sal: 1 mM (círculos rojos), 10 mM (cuadrados azules) y 100 mM (diamantes verdes). Además, en línea continua negra, con fines comparativos, se muestra la carga ideal de la proteína.

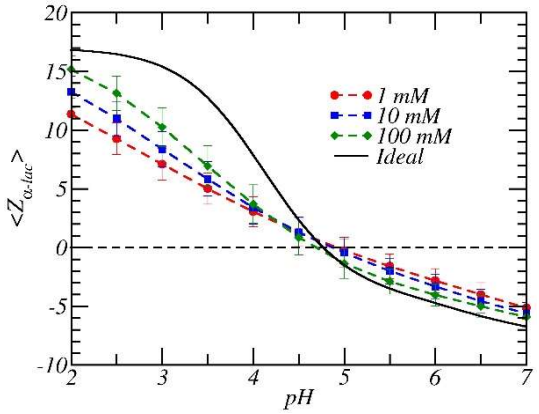


Figura 2. Carga neta de la proteína aislada como una función del pH, a diferentes concentraciones de sal agregada.

En condiciones extremadamente ácidas la proteína α-lactoalbúmina se encuentra cargada positivamente $\langle Z_{\alpha-lac}\rangle \cong +11$ para $c_{salt} = 1\,mM$. Luego, la carga neta disminuye a medida que aumenta el valor de pH. Se observa que la carga neta de la proteína es menor en comparación con la carga ideal, esto se debe a que en la simulación de Monte Carlo se considera el ambiente electrostático en la titulación de los residuos mientras que en condiciones ideales no. Considerando un valor $pH = 3$, se puede observar que la proteína presenta una carga de $\langle Z_{\alpha-lac}\rangle \cong +8$, mientras que en condiciones ideales es de $Z_{ideal} \cong +15$. A medida que se incrementa el pH hay un punto en el cual la carga se hace cero, este es el punto isoeléctrico (pI) de la proteína. El mismo tiene un valor de alrededor de pI=4.8 para la concentración de sal mas pequeña. Este valor se aproxima bastante bien al encontrado experimentalmente. A valores de pH superiores la carga de la proteína continúa disminuyendo y toma valores negativos. A $pH = 7$ se encontró que la carga fue de $\langle Z_{\alpha-la}\ \rangle \cong -5$.

Para $c_{salt} = 10\,mM$ se observó un comportamiento similar al de $1\,mM$. En cambio, para $c_{salt} = 100mM$ se observó un incremento mayor comparado al de $1\,mM$ en la carga positiva. A valores de pH superiores al pI la tendencia fue similar en los tres casos y se asemejó al comportamiento ideal de la proteína.

A continuación, resulto de interés analizar cómo era la distribución de cationes y aniones en la proteína aislada considerando los distintos valores de fuerza iónica.

En la figura 3 se muestra la concentración radial de iones pequeños como una función de la distancia r al centro de masa de la proteína a $pH = 3.0$. Los resultados de la simulación de Monte Carlo son mostrados en símbolos rojos para $1\,mM$ (círculos), $10\,mM$ (cuadrados) y $100\,mM$ (diamantes) y en los mismos símbolos, pero vacíos y azules la concentración de cationes. Las líneas continuas para aniones y líneas de trazo para cationes son agregadas como guía visual. La función $c^k(r)$ fue graficada como una función logarítmica para poder realizar la comparación entre las tres concentraciones de sal en un solo gráfico. En la figura 2, ser observó que en el rango de pH inferior al punto isoeléctrico se notó la mayor diferencia entre las tres concentraciones de sal, por lo tanto, resulto de interés analizar la concentración radial a un valor de $pH = 3.0$

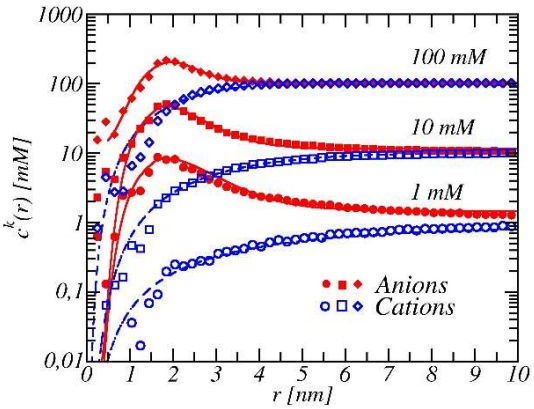


Figura 3. Concentración radial de iones pequeños como una función de la distancia r a pH=3.0.

Cerca del centro de la proteína ($r = 0$) se observa que la concentración radial de aniones y cationes pequeños es muy baja para las tres concentraciones de sal. Para $c_{salt} = 100\,mM$, a medida que r aumenta la concentración radial de aniones aumenta rápidamente hasta alcanzar un máximo alrededor de $r = 2$. Dado que la proteína tiene una carga neta positiva los aniones son atraídos a la superficie de la proteína. Luego de este máximo, la concentración de aniones disminuye hasta igualar la concentración en el seno de la solución (100 mM) a $r \approx 5\,nm$. Por el contrario, la concentración de cationes tiene un comportamiento ligeramente diferente al de aniones. En este caso, la concentración radial de cationes es muy baja dentro de la proteína y aumenta gradualmente hasta que alcanza c_{Bulk}, a $r \approx 5\,nm$. Es decir, que a partir de esta distancia las concentraciones de aniones y cationes pequeños se igualan a la concentración del seno de la solución. Esta distancia a la cual ambas concentraciones de iones se igualan es un indicativo del espesor de la doble capa eléctrica que se forma. Se observa que a medida que aumenta la concentración de sal este espesor disminuye. El comportamiento para 1 mM y 10 mM es similar, alcanzando su concentración máxima correspondiente. En los tres casos el máximo de la concentración de aniones estuvo ubicado en $r = 2\,nm$. La posición del máximo es un indicativo del tamaño de la proteína, ya que la mayor concentración de iones pequeños se

produciría en la superficie de la misma. Además, como la proteína en estas condiciones tiene una carga positiva se esperaría una elevada concentración de aniones por atracción electrostática entre ambos.

A continuación, vamos a analizar los valores que toma el potencial electrostático a lo largo de los ejes coordenados x, y y z. En la figura 4 se muestra el potencial electrostático como una función de la distancia r al centro de masa de la proteína a $pH = 3.0$ y $c_{salt} = 10\,mM$. En esta figura se presenta el potencial electrostático en función de cada uno de los ejes cartesianos.

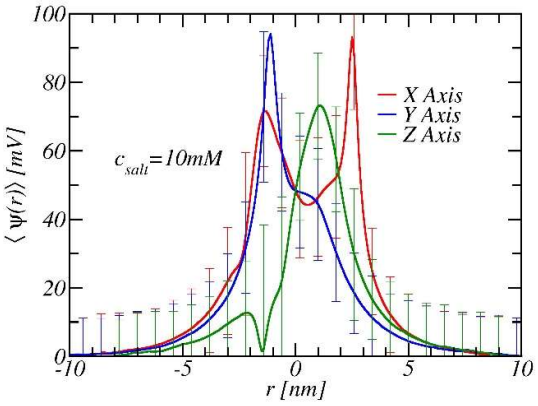


Figura 4. Potencial electrostático como una función de la distancia r a pH=3.0.

El potencial electrostático sobre el eje X se muestra como una curva roja. Para valores de r muy negativos $r < -10\,nm$, es decir alejados del centro de la proteína el potencial electrostático es prácticamente nulo. A medida que r aumenta y se acerca al centro, el potencial aumenta gradualmente hasta alcanzar un máximo de $\psi(r) = 70\,mV$. Luego, el $\psi(r)$ disminuye levemente y llega a un mínimo local de $\psi(r) \approx 45\,mV$ en $r = 0\,nm$. El potencial comienza aumentar nuevamente hasta alcanzar un máximo absoluto en $r = 3\,nm$ de alrededor de $\psi(r) \approx 90mV$. Luego disminuye gradualmente hasta hacerse casi cero alejado de la proteína.

En el caso de las curvas del potencial electrostático en Y y Z, el comportamiento es similar en los extremos de r. Sin embargo, el potencial electrostático en Y presento un solo máximo absoluto a $r = -1\,nm$ de $\psi(r) \approx 90\,mV$, al igual que el potencial electrostático en Z el cual presenta un máximo de $\psi(r) = 70\,mV$ a $r = 1nm$.

El potencial electrostático analizado en función de cada uno de los ejes presento diferentes tendencias. Se observó los máximos y mínimos encontrados presentaron distintas alturas y posiciones. Es decir, el potencial es asimétrico con respecto a los distintos ejes de la proteína. Esto sugiere que el potencial electrostático tiene una correlación con la estructura que presenta la proteína. Por lo tanto, se podría sugerir que la proteína presenta una estructura asimétrica.

Luego, se estudió el potencial electrostático promedio $\langle\psi(r)\rangle$ para la proteína aislada. En la figura 5, se muestra el potencial electrostático promedio como una función de la distancia r a $pH = 3.0$ y $c_{salt} = 10\,mM$.

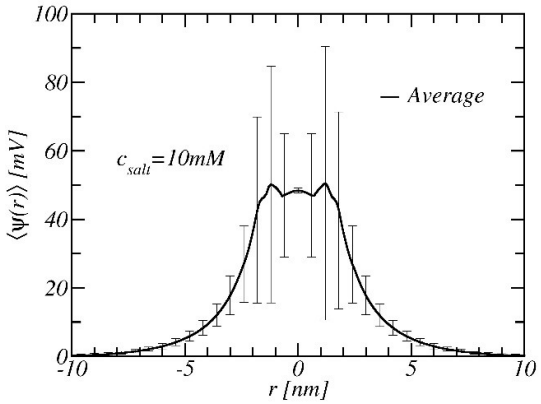


Figura 5 Potencial electrostático como una función de la distancia r a pH=3.0.

El potencial electrostático promedio a los extremos de r, es decir lejos del centro de la proteína, tiene un valor de cero. Luego a medida que nos acercamos a $r = 0$ el $\langle\psi(r)\rangle$ aumenta gradualmente. En este caso, el potencial presenta un máximo de $\langle\psi(r)\rangle \approx 50\,mV$ con dos picos levemente superiores al valor de máximo en $r = 0$. Es interesante observar que, en comparación a la Figura 4, en este cálculo de potencial electrostático promedio se pierde información con respecto a la asimetría que presenta la proteína. Esto es debido a que, tanto los máximos absolutos, locales o mínimos locales son los que brindan información acerca de la estructura de la proteína y distribución de sus cargas. Sin embargo, en el potencial electrostática promedio se ven resumidos en un solo máximo.

Para comprender la relación entre la estructura de la proteína y el potencial electrostático de la misma, se realizó un mapeo sobre el plano XY.

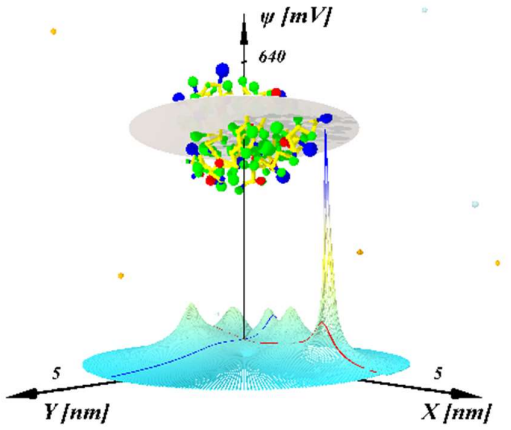


Figura 6. Potencial electrostático sobre el plano XY a pH=3 y una concentración de sal de 10 mM.

En la figura 6 se muestra el potencial electrostático en el Plano XY junto con una captura de la simulación de la proteína por encima a $pH = 3.0$ y $c_{salt} = 10\,mM$. Conjuntamente se muestra el potencial electrostático en X e Y de la figura 5 como curvas roja y azul respectivamente.

Se puede observar en la figura que la proteína presenta un máximo absoluto, un mínimo absoluto y varios máximos locales. El máximo absoluto tiene un valor de $\psi(r) \approx 450\,mV$, y puede ser explicado observando la estructura de la proteína en la parte superior. Se puede notar que en la posición del máximo absoluto se encuentra un grupo Histidina cargado sobre el plano XY, esto genera el gran máximo en dicha posición. Adicionalmente, fueron gráficos las curvas del potencial electrostático para el eje X y eje Y de la figura 4. Se observa que ambos potenciales siguen perfectamente el perfil del potencial en dicho eje.

Un aspecto interesante que se resalta en esta figura es la asimetría del potencial electrostático en el Plano XY con un máximo absoluto, un mínimo absoluto y varios máximos locales. Además, se destaca la relación con la estructura de la proteína que se observa en el modelo presenta asimetría estructural como así también en la distribución de los grupos cargados.

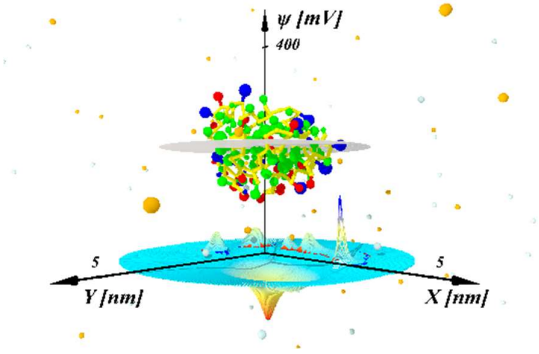


Figura 7. Potencial electrostático en el plano *XY* a pH=7 y una concentración de sal de 10 mM.

La Figura 7 muestra el potencial electrostático en el plano XY a $pH = 7.0$ y $c_{salt} = 10mM$. Como se observó en la figura 2, en estas condiciones la proteína presenta una carga negativa de -5. En la figura se puede notar que hay un mínimo absoluto, un máximo absoluto, y varios máximos locales. El máximo absoluto observado se encuentra en la misma posición al de la figura 6, sin embargo, en este caso presenta un valor inferior de $\psi(r) \cong 135\,mV$. Opuestamente, el mínimo absoluto se encontró que tenía un valor de $\psi(r) \cong -126\,mV$. Observando la estructura de la proteína graficada en la parte superior se puede notar que existe un grupo ácido cargado negativamente ubicado sobre el plano XY de la proteína.

Comparando las figuras 6 y 7, se puede notar que en las condiciones de $pH = 3$ con carga neta positiva el potencial electrostático es mayormente positivo en toda la superficie de la proteína. Además, el máximo absoluto es mucho más elevado que el encontrado en la figure 7. Por otro lado, en las condiciones de $pH = 7$, donde la carga neta de la proteína es negativa se observa una disminución notable del potencial electrostática y la presencia de un mínimo absoluto muy marcado en el centro de la proteína.

Para estudiar el efecto de la concentración de sal en la proteína aislada se comparó el potencial electrostático en los tres casos a un valor de pH constante.

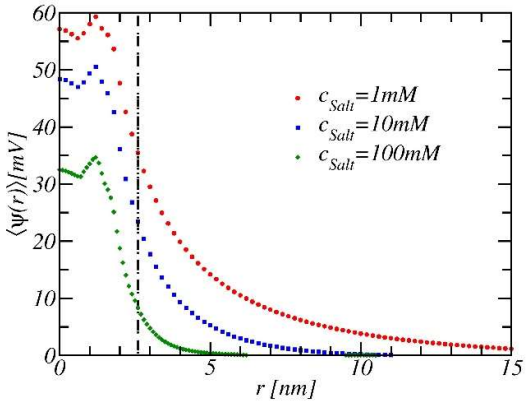


Figura 8. Potencial electrostático como una función de la distancia r a pH=3.0.

La figura 8 muestra el potencial electrostático promedio como una función de la distancia r para $1mM$ (círculos rojos), $10mM$ (cuadrados azules) y $100mM$ (diamantes verdes). También se representa en $r = 2.6$ el límite del tamaño de la proteína en línea negra de trazo.

El potencial electrostático tiene un valor positivo de $\langle\psi_A\rangle = 58\,mV$ en el centro de la proteína (r = 0) para $c_{salt} = 1\,mM$. Luego, al aumentar la distancia hay un leve incremento en el valor del potencial para alcanzar el máximo de $\langle\psi_A\rangle = 60\,mV$ a $r = 1.5\,nm$. El potencial electrostático posterior a alcanzar el máximo disminuye gradualmente hasta llegar a cero a un valor de distancia $r > 15\,nm$. El perfil del potencial electrostático para $c_{salt} = 10\,mM$ y $c_{salt} = 100\,mM$ mostro una tendencia similar a $c_{salt} = 1mM$. Se puede observar que en ambos casos las curvas siguen una tendencia similar, sin embargo, el máximo de potencial alcanzado es inferior al de $c_{salt} = 1\,mM$. Se puede notar que la distancia a la cual el potencial electrostático se hace cero disminuye a medida que la concentración de sal aumenta. Para $c_{salt} = 100\,mM$ la distancia a la cual se llega un potencial cero es a $r > 5nm$.

Para un valor de pH constante se puede observar que al incrementar el valor de la fuerza iónica el potencial electrostático promedio disminuye considerablemente.

4. Conclusiones

La proteína α-lactoalbúmina fue estudiada mediante simulaciones de Monte Carlo a tres concentraciones de sal: 1 mM, 10 mM, y 100 mM; y en un amplio rango de pH. En primera instancia se analizó la carga de la proteína aislada, se encontró que la misma se ve afectada por la concentración de sal. Con el incremento de la concentración de sal, la carga neta de la proteína adquirió valores de carga más positiva, acercándose a la carga a su comportamiento en condiciones ideales. El punto isoeléctrico de la proteína fue estimado en 4.9 lo cual está de acuerdo con el valor ideal estimado. La concentración radial de iones pequeños mostró que a un pH ácido, condiciones donde la proteína presenta carga positiva, se produce una alta concentración de aniones sobre la superficie de la misma. Por otro lado, cuando la posición se aleja del centro de masa de la proteína la concentración de iones se iguala a la concentración en el bulk. El potencial electrostático fue analizado para la proteína aislada y en diferentes condiciones de sal y pH. Se encontró que el potencial electrostático es asimétrico cuando se lo analiza en función de cada uno de los ejes. Luego, en el cálculo del potencial electrostático promedio la curva mostro solo un máximo y hacia los extremos un valor de cero. Comparando ambos potenciales se puede concluir que en el potencial electrostático promedio se pierde información relacionada a la estructura asimétrica de la proteína. Dicha estructura asimétrica se vio más claramente realizando un mapeo del potencial electrostático en el Plano XY. De esta forma, se encontró que la proteína presenta diversos máximos locales, un máximo absoluto y un mínimo absoluto en toda su superficie. Lo cual demostró que la presencia de dichos máximos y mínimos esta directamente relacionado con la estructura y distribución de las cargas de la proteína. Además, se realizó una comparación del potencial electrostático promedio a los tres valores de concentración de sal estudiados. Se observó que el mismo se ve afectado por la fuerza iónica. A medida que se aumenta la concentración de sal agregada se produce una disminución del potencial electrostático promedio.

5. Referencias

Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., & Teller, A. H. (1953). Metropolis. *The Journal of Chemical Physics*, *21*(6), 1087–1092. https://doi.org/doi:10.1063/1.1699114

Tobochnik, J., McKay, S. R., Christian, W., Smit, B., & Frenkel, D. (2013). Understanding Molecular Simulation. *Computers in Physics*. https://doi.org/10.1063/1.4822570

Torres, P. B., Quiroga, E., Ramirez-Pastor, A. J., Boeris, V., & Narambuena, C. F. (2019). Interaction between β-Lactoglobuline and Weak Polyelectrolyte Chains: A Study Using Monte Carlo Simulation. *The Journal of Physical Chemistry B*. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b03276

Torres, P., Bojanich, L., Sanchez-Varretti, F., Ramirez-Pastor, A. J., Quiroga, E., Boeris, V., & Narambuena, C. F. (2017). Protonation of β-

lactoglobulin in the presence of strong polyelectrolyte chains: a study using Monte Carlo simulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *160*,161–168. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.018

Torrie, G. M., & Valleau, J. P. (1980). Electrical double layers. I. Monte Carlo study of a uniformly charged surface. *The Journal of Chemical Physics*, *73*(11),5807–5816. https://doi.org/10.1063/1.440065

03TCA - Estudio de la adición de quitooligosacáridos a yogur y su efecto en la digestibilidad *in vitro* de lípidos.

Chitoologosaccharides addition to yogurt and its effect on the *in vitro* lipid digestibility.

Marina Dello Staffolo[1], M. Susana Rodriguez[2]

1. Planta Piloto de Ingeniería Química – PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur-CONICET), Camino La Carrindanga Km7 (B8000FWB), Bahía Blanca, Argentina. Departamento de Ing. Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), 1 y 47, La Plata, Argentina. Correo electrónico de contacto: marinadellostaffolo@gmail.com
2. INQUISUR-UNS-CONICET, Dto. de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina

Resumen

La finalidad de este trabajo fue evaluar los perfiles de ácidos grasos y el contenido de ácido linoléico conjugado (CLA) luego de una digestión química de yogures frescos suplementados con quitooligosacáridos (COS). Además, se estudiaron la composición nutricional, el contenido de ácido láctico y los recuentos de bacterias ácido lácticas (LAB) de los yogures adicionados con distintas concentraciones de COS. El perfil de ácidos grasos y la lipólisis de yogures suplementados con 0,1% de COS no se vieron afectados luego de la digestión química, observándose solo un descenso significativo de los porcentajes de CLA. No hubo diferencias significativas en la composición nutricional y los recuentos viables entre los controles y los yogures suplementados con concentraciones de hasta 0,1% p/p de COS. Sin embargo, la acidificación de la leche disminuyó con 0,5% de COS y la gelificación del yogur no se logró con 3,0% de COS. En conclusión, los resultados del presente estudio aportan un mayor entendimiento al uso de los COS como ingrediente funcional.

Palabras clave: quitooligosacáridos, yogur, composición, digestión química.

Abstract

The purpose of this work was to evaluate the fatty acid profiles and the conjugated linoleic acid (CLA) content after chemical digestion of fresh yogurts supplemented with chitooligosaccharides (COS). In addition, the nutritional composition, lactic acid content and lactic acid bacteria (LAB) counts of the yogurts added with different concentrations of COS were studied. The fatty acid profile and lipolysis of yogurts supplemented with 0.1% COS were not affected after chemical digestion, with only a significant decrease in the percentages of CLA. There were no significant differences between the nutritional composition and viable counts of controls and yogurts supplemented with concentrations up to 0.1 % w/w COS. However, the acidification of the milk decreased with 0.5 % COS and the yogurt formation failed with 3.0 % COS. In conclusion, the results of the present study provide a better understanding of the use of COS as a functional ingredient.

Keywords: COS, yoghurt, composition, chemical digestion

1. Introducción

Los quitooligosacáridos (COS), también llamados oligoquitosanos, se obtienen a partir de la hidrólisis del quitosano, un polisacárido catiónico obtenido por desacetilación parcial de la quitina, un polímero natural que se encuentra en los caparazones de los crustáceos. Los COS tienen un tamaño molecular más pequeño que el quitosano y, por tanto, menor viscosidad y mayor solubilidad en soluciones acuosas (Mukarran *et al.*, 2022). Como moléculas bioactivas, los COS muestran efectos antitumorales in vivo e in vitro, mejora de la absorción de calcio y aumento de la fuerza ósea, (Zhai *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2015) beneficios en el tratamiento del asma, (Aam *et al.*, 2010) y modulación de la obesidad y la inflamación asociada. (Hu et al., 2021; Baboota *et al*., 2013) Las actividades biológicas descritas para COS, como la reducción del colesterol en sangre y la presión arterial, dependen del peso molecular

(MW) o del grado de polimerización (DP) y del grado de desacetilación (DD) (Liaqat y Eltem, 2018; Jeon *et al.*, 2000). Se ha afirmado que COS alcanza la circulación sistémica después de la administración oral. Esto se debe a que los COS son absorbibles casi al 100% a lo largo del tracto gastrointestinal (GIT) y a través de otras membranas mucosas en comparación con el quitosano. La capacidad de absorción in vivo de los oligómeros aumenta, mientras que la citotoxicidad disminuye al disminuir el peso molecular (PM). Los COS con un peso molecular de 3,8 kDa o inferior (DD 88%) mostrarían los mejores perfiles biológicos. Además, los COS se eliminan rápidamente por el hígado y el riñón y luego se excretan en la orina o se absorben en el músculo esquelético y el cartílago articular. (Chae *et al.*, 2005; Baldrick, 2010; Naveed *et al.*, 2019).

Debido a la solubilidad en agua de los COS, se facilita su incorporación en alimentos. Además, los COS no son tóxicos, son biocompatibles, biodegradables y tienen otras excelentes propiedades biológicas, como ser la inhibición de bacterias patógenas, actividad antioxidante y prebiótica, lo que los hace superiores al quitosano para su aplicación en la industria alimentaria con el objeto de mejorar la seguridad, la calidad y la vida útil de los alimentos (Laokuldilok *et al.*, 2017; Rajabi, 2019; Ji *et al.*, 2021). El yogur constituye una matriz ideal para el diseño de alimentos funcionales principalmente por ser muy valorado por los consumidores.

Teniendo en cuenta el creciente interés en el uso de COS como nuevos ingredientes alimentarios y que el quitosano, un polímero policatiónico, interfiere con la absorción de lípidos al unirse a lípidos y ácidos grasos (Beysseriat *et al.*, 2006), el objetivo del presente trabajo fue evaluar los perfiles de ácidos grasos y el contenido de CLA luego de una digestión química de yogures frescos suplementados con COS. Además, se estudiaron la composición nutricional, el contenido de ácido láctico y los recuentos de bacterias ácido lácticas (LAB) de los yogures adicionados con distintas concentraciones de COS.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de los quitooligosacáridos (COS). El quitosano se obtuvo a partir de desechos de camarón (Pleoticus mülleri) de la industria pesquera del puerto de Ing. White (Bahía Blanca, Provincia de Bs. As.), como se informó anteriormente (Rodríguez *et al.*, 2008). El peso molecular promedio del quitosano fue de 468,186 kDa, evaluado por viscosimetría y calculado a partir de la viscosidad intrínseca experimental utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (Roberts y Domszy, 1982). El contenido de humedad fue del 6,58% y el contenido de cenizas fue del 0,53%. El grado de desacetilación (DD) se evaluó mediante los procedimientos descritos anteriormente (Terrile *et al.*, 2015). La hidrólisis de quitosano (2 g) se realizó con H_2O_2 al 12,5% v/v durante 20 min a temperatura ambiente. Después de irradiar en un horno microondas a 700 W durante 4 min, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a presión reducida. Los COS se precipitaron con 150 ml de etanol al 98% v/v del filtrado. Después de 15 min, el residuo se filtró a presión reducida y se lavó varias veces con etanol hasta que una reacción negativa con KMnO4 (0,02 M) confirmó la ausencia de H_2O_2. El producto resultante se disolvió en agua destilada y se liofilizó. Todos los reactivos fueron de calidad analítica. El peso molecular medio de COS fue de 2,764 kDa, el contenido de humedad fue del 13,3%, el contenido de cenizas fue del 2,60% y el DD fue del 68%.

2.2 Preparación del yogur. El yogur se preparó de acuerdo con un método previamente informado (Dello Staffolo *et al*., 2011). La leche desnatada reconstituida (15% p / p, La Serenísima, Argentina) con 5% de sacarosa se calentó a 80 °C durante 30 min, se enfrió a temperatura ambiente y se suplementó con 0.05, 0.1, 0.5 y 3% p/p de COS. Después de la homogeneización, 1 mL de un cultivo fresco de *Streptococcus thermophilus* (colección CP2 CIDCA 321) y 1 mL de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Lbp, colección CIDCA 332) fue adicionado a 100 g de leche con sacarosa y suplementada con COS. El yogur control se obtuvo mediante el mismo procedimiento sin la adición de COS. Las muestras se incubaron a 40 ± 1 °C hasta pH 4,4-4,6 y almacenado a 4 ± 1 °C una vez finalizado el proceso de fermentación. Los fermentos se activaron durante 24-48 h a 40 ± 1 °C en leche desnatada autoclavada (120 °C, 20 min) antes de inocular los yogures, hasta alcanzar una biomasa de $\sim 10^8$ UFC/mL. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.3 Recuentos viables. Se suspendieron alícuotas de 1 g de yogur en 100 mL de solución fisiológica estéril. Se prepararon diluciones seriadas y se esparcieron 100 µL de cada dilución en placas de agar De Man, Rogosa y Sharpe (Laboratorios Britania S.R.L., Buenos Aires, Argentina) para estudiar las bacterias ácido lácticas (LAB). Las placas se incubaron durante 24 h a 40 ± 1 °C. Las colonias que crecieron en estas condiciones se contaron e identificaron como bacterias ácido lácticas. Las muestras se analizaron por triplicado.

2.4 Análisis composicionales. Las muestras de yogur se analizaron después de 24 h de

almacenamiento a 4ºC. El contenido de proteína se midió por el método de Kjeldahl, utilizando el factor de conversión 6,38 (método 24.027, AOAC, 1984), y el contenido de grasa se determinó por el método de Gerber. La acidez se midió mediante titulación con NaOH 0,1 N y se expresó como el porcentaje de ácido láctico (g de ácido láctico por 100 g, método 907.124, AOAC, 1995). El contenido de cenizas se cuantificó mediante la incineración en seco de las muestras en un horno de mufla a 550 °C durante 24 h (método 24.009, AOAC, 1984). El contenido de agua se determinó mediante secado en horno a 105 ° C (método 24.002, AOAC, 1984). Todos los análisis se realizaron por triplicado. Todos los reactivos fueron de calidad analítica.

2.5 Extracción de lípidos y metilación de ácidos grasos. Para su posterior análisis, se extrajeron tres veces alícuotas de 700 mg de yogur con 700 µL de una solución de cloroformo/ metanol (2:1 v/v, grado analítico, Cicarelli, ≥99,0%, Buenos Aires, Argentina). Para mejorar la extracción, las muestras se agitaron a 230 rpm durante 15 min. Para romper la emulsión, las muestras se centrifugaron a 4200 rpm durante 5 min. La fase orgánica se recogió y se vertió en un tubo de vidrio limpio. Las muestras se redujeron bajo una corriente de nitrógeno y se añadió 1 ml de HCl metanólico al 10 % (v/v). Esta solución se preparó con HCl al 37 % (p/v) (para análisis, Merck, Buenos Aires, Argentina) y metanol anhidro (grado analítico, Biopack, ≥ 99,8 %, Buenos Aires, Argentina). La reacción se mantuvo a 50 ° C durante 20 min. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente, los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron dos veces con 1 mL de n-hexano (grado cromatográfico, U.V.E. Dorwil, Buenos Aires, Argentina) y se lavó una vez con 1 mL de NaOH al 1.2 % (p/v) (grado analítico, Anedra, ≥ 99.8%, Buenos Aires, Argentina). Las muestras se secaron inmediatamente bajo una corriente de nitrógeno y se sometieron a análisis cromatográfico o se almacenaron bajo una atmósfera de nitrógeno. Los lípidos se extrajeron mediante procedimientos similares luego de la digestión química. Se extrajeron alícuotas de 15 mL de la suspensión digerida tres veces con el mismo volumen de la solución de cloroformo / metanol (2:1, v/v), se mezclaron y se centrifugaron. La fase orgánica se concentró con un evaporador rotatorio a 45 ° C y los extractos resultantes se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Las muestras se disolvieron en 500 µL de cloroformo deuterado para análisis de RMN. Una vez que se registraron los espectros, se metilaron 100 µL del volumen total para los análisis de GC-MS. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.6 Análisis de cromatografía de gases. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía GC-MS con un cromatógrafo 7890B equipado con un espectrómetro de masas 5977A (Agilent Technologies). El modo de ionización fue el impacto de electrones y la energía de ionización fue de 70 eV. Se inyectaron muestras (1 µl) en una columna capilar HP-5Ms (30 m x 0,25 mm de d.i. x 0,25 µm de espesor de película). La temperatura se programó de 150 °C a 250 °C a una velocidad de 4 °C min^{-1} y se mantuvo a la temperatura final durante 15 min. La temperatura del inyector y del detector fue de 280 ° C. El gas portador fue Helio con un caudal de 1 ml min^{-1} con una relación de 20:1. Las composiciones de ácidos grasos se expresaron como porcentajes relativos (p/p). Los isómeros de CLA se identificaron comparando sus tiempos de retención y patrones de fragmentación de masa con los de los estándares: c9, t11-ácido octadecadienoico, t10, c12 y otros isómeros menores, incluidos t9, t11. Los estándares de ésteres metílicos de ácido linoleico conjugado se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EE. UU. (CÓDIGO O5507).

2.7 Experimentos de resonancia magnética nuclear. Los espectros de RMN ^{1}H de los extractos de lípidos se obtuvieron con un espectrómetro de RMN Bruker Avance Ultrashield de 300 MHz (Praga, República Checa), utilizando $CDCl_3$ (99,8% de átomo D, Sigma – Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EE. UU., CÓDIGO 151823) como disolvente y protones residuales como referencia interna (7,26 ppm). Los espectros se registraron a 300 K, 16 barridos con un ancho espectral de 6000 Hz.

2.8 Modelo experimental digestivo químico. La digestión química ha sido descrita previamente por Rodríguez *et al*. (2008). Los procedimientos se realizaron de la siguiente manera: se agitaron 12,5 g de yogur en 50 mL de HCl 0,1 M (Merck) durante 1 h a pH 1,0–2,0, a 30 rpm y 37 °C para reproducir el ambiente gástrico. El pH se ajustó a 6,8-7,2 con 15 g por L de $NaHCO_3$ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE. UU.) y la velocidad de agitación se aumentó de 30 a 300 rpm, mientras que la temperatura se mantuvo a 37 °C para reproducir fisicoquímicamente el medio duodenal. Todos los reactivos fueron de calidad analítica.

2.9 Análisis estadístico. Los porcentajes relativos de análisis de composición se expresaron como la media ± el error estándar de la media. Las diferencias significativas se probaron utilizando un ANOVA de dos vías. Las pruebas posteriores de comparación de medias se realizaron utilizando el método de Bonferroni para comparaciones múltiples.

3. Resultados y Discusión

La composición de los yogures obtenidos por fermentación de leche suplementada con 0.1 y 0.05% p/p de COS cumplió con las normas para yogur definidas por el Codex Alimentarius (2003). A una concentración de 0.5% p/p, el porcentaje de ácido láctico disminuyó significativamente ($p < 0.05$, **Tabla 1**) para alcanzar el mínimo aceptado por el Codex (2003).

Tabla 1. Composición y recuentos de LAB de yogures suplementados con COS.

COS (%)	0	0.05	0.1	0.5
Acidez (% ac. lac.)	1.57 ± 0.02[a]	1.60 ± 0.02	1.49 ± 0.05	0.68 ± 0.01[b]
Lípidos (g%)	1.45 ± 0.05	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.01
Agua (g%)	83.70 ± 1.45	80.80 ± 0.01[b]	80.85 ± 0.15[b]	79.50 ± 0.50[c]
Proteínas (g%)	3.10 ± 0.15	3.00 ± 0.15	2.97 ± 0.17	3.40 ± 0.10
Cenizas (g%)	0.86 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.87 ± 0.01
LAB 24h (UFC/g)	8.3 10^8 ± 0.04	8.4 10^8 ± 0.09	8.3 10^8 ± 0.10	2.2 10^8 ± 0.10

[a] media ± S.E.M. [b] $p< 0.05$ y [c] $p< 0.001$ comparados con el yogur control de 0% COS.

Cuando se agregó COS a 3,0% p/p, la acidificación falló de tal manera que no se produjo la coagulación de la proteína y la consistencia del producto se asemejaba a la de la leche. Esto sugiere que la producción de ácido láctico y, por tanto, la actividad metabólica bacteriana, se vio marcadamente afectada por concentraciones crecientes de COS cuando excedió el 0,5% p/p. Los recuentos viables de LAB, sin embargo, permanecieron en el orden de 10^8 UFC/g a 0, 0,05, 0,1 y 0,5 % p/p de COS. El contenido de agua disminuyó cuando se añadió COS. Esto sugiere que COS, como otros oligosacáridos, puede retener agua. Otras características nutricionales de los yogures, como el contenido de grasa y proteínas, no se modificaron. Teniendo en cuenta este resultado preliminar, se seleccionaron concentraciones de 0,1% y 0,05% para los siguientes análisis.

La acidez titulable y los recuentos de LAB se controlaron durante un período de almacenamiento de 28 días a 4 °C (**Fig. 1**). La acidez tendió a aumentar desde el día 1 al día 21 y disminuir el día 28. Sin embargo, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas, excepto por la acidez titulable entre el control y los yogures con COS al 0,1% en el día 1 ($p < 0,05$). Para el conteo de LAB, se observó la tendencia contraria. Los recuentos viables se mantuvieron por encima de 10^7 UFC/g durante el período estudiado y la acidez estuvo en el rango de 1,2 a 1,8 g de ácido láctico cada 100 g de yogur. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los estándares definidos para yogures según el Codex Alimentarius (2003).

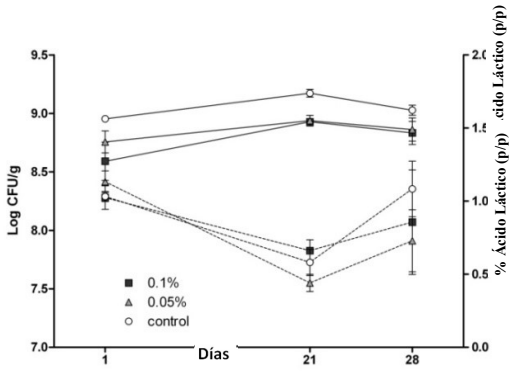


Figura 1. Acidez titulable (línea continua) y recuentos viables (línea discontinua) de yogures en los días 1, 21 y 28 de almacenamiento.

Se realizó una digestión química gastrointestinal de los yogures suplementados con 0,1% de COS mediante un modelo *in vitro*. En este ensayo se observó que no se formaron flóculos en el entorno duodenal simulado a pH 6,2, debido a que los COS son solubles en un amplio rango de pH a causa de su pequeña longitud de cadena (Naveed *et al.*, 2019). Los lípidos se extrajeron de la suspensión resultante de la digestión y se analizaron mediante ^{1}H NMR. La lipólisis se evidenció mediante diferentes patrones de las señales de RMN de ^{1}H entre 3,5 y 4,5 ppm asignadas a los protones de glicerilo (señales Gly2 en la **Fig. 2**). Antes de la digestión, estas señales aparecieron como un sistema de dos dobletes a 4,29 y 4,15 ppm. Según Nieva-Echevarría *et al.*, (2014), el cambio químico y la multiplicidad de estas señales se ven afectados notablemente por la presencia o ausencia de las cadenas de acilo unidas a la columna vertebral de glicerilo. En este trabajo, los mono y diglicéridos se evidenciaron por la aparición de nuevas señales entre 4,17 ppm y 3,60 ppm. Ambas muestras digeridas, a saber, los yogures de control y suplementados con COS al 0,1 % p/p, mostraron espectros NMR y perfiles de ácidos grasos casi idénticos (**Fig. 2** y **Tabla 3**, respectivamente). Esto sugiere que el perfil de los ácidos grasos y la hidrólisis de lípidos no se vieron afectados por la adición 0,1% de COS a los yogures.

Como se muestra en la **Tabla 3**, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de CLA de los yogures de control y los suplementados luego de la digestión química. Sin embargo, cuando

se compararon los perfiles de ácidos grasos de la **Tabla 3** con los datos que se muestran en la **Tabla 2**, quedó claro que los porcentajes de CLA se redujeron significativamente después de la digestión química en yogures suplementados con COS. Durante el almacenamiento, estos porcentajes variaron de 0,5 a 1,2 % en cada grupo (**Tabla 2**), pero disminuyó al 0,2 % después de la digestión (**Tabla 3**).

C18:1	1.05 ± 0.15	0.54 ± 0.54
C18	25.23 ± 5.0	33.59 ± 12.04
CLA	0.42 ± 0.07	0.17 ± 0.02
NI[c]	2.86 ± 0.89	5.77 ± 0.88

[a] ácido linoleico; [b] ácido oleico; [c] no identificado

de los porcentajes de CLA después de la digestión ($p < 0,001$, prueba t). Por el contrario, los porcentajes de CLA de los yogures controles no fueron diferentes antes y después de la digestión (**Tablas 2 y 3**). Esto muestra que las sustancias

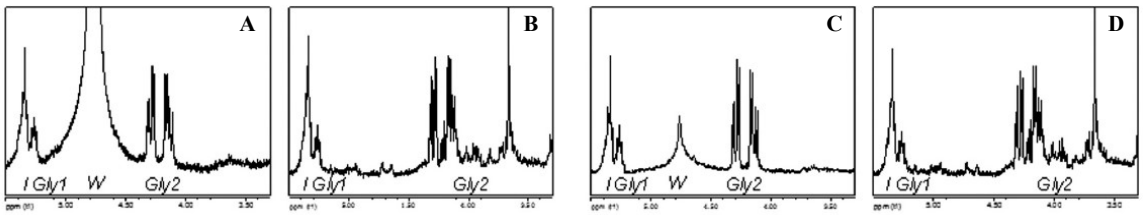


Figura 2. Secciones de espectros de RMN ^{1}H de lípidos de yogur. Gly1 y Gly2 se refieren a protones de glicerilo unidos a C2 y C1 / C3 respectivamente. A) Control; B) Control luego de la digestión química; C) COS 0,1%; D) COS 0,1% luego de la digestión química. l = protones olefínicos. W = señal de agua.

Tabla 2. Perfiles de ácidos grasos de yogures suplementados con COS durante 28 días de almacenamiento.

	D1			D21			D28		
	control	0.05%	0.1%	control	0.05%	0.1%	control	0.05%	0.1%
C14:1	0.43 ± 0.25	0.43 ± 0.43	0.00	0.33 ± 0.16	0.42 ± 0.17	0.63 ± 0.31	0.55 ± 0.02	0.43 ± 0.14	0.47 ± 0.14
C14	3.77 ± 3.77	5.17 ± 5.17	2.27 ± 2.07	4.91 ± 2.88	8.09 ± 1.29	5.94 ± 0.36	7.95 ± 0.36	6.74 ± 1.13	7.66 ± 0.99
C15	0.37 ± 0.37	0.67 ± 0.40	0.18 ± 0.18	0.67 ± 0.26	0.45 ± 0.05	0.40 ± 0.12	1.41 ± 0.04	1.21 ± 0.23	1.31 ± 0.24
C16:1	1.48 ± 0.54	1.12 ± 0.39	1.93 ± 0.58	1.06 ± 0.31	1.15 ± 0.42	0.64 ± 0.06	1.77 ± 0.17	1.47 ± 0.09	1.34 ± 0.15
C16:1	-	-	-	-	-	-	0.15 ± 0.15	0.11 ± 0.11	-
C16	27.29 ± 4.05	27.22 ± 5.17	22.96 ± 2.21	26.58 ± 4.81	28.20 ± 2.61	26.11 ± 0.19	30.89 ± 0.74	28.07 ± 0.74	29.16 ± 0.92
C17	1.50 ± 0.56	0.45 ± 0.22	0.70 ± 0.10	1.49 ± 0.25	1.21 ± 0.50	1.26 ± 0.05	1.64 ± 0.04	1.60 ± 0.17	1.55 ± 0.25
LA[a]	4.52 ± 0.26	5.13 ± 0.87	6.10 ± 0.89	6.80 ± 0.81	7.38 ± 0.19	7.40 ± 0.69	6.67 ± 0.56	7.32 ± 0.76	6.84 ± 0.85
OLE[b]	14.79 ± 1.50	19.28 ± 0.91	17.72 ± 1.35	20.13 ± 7.19	16.27 ± 1.05	16.89 ± 0.15	14.67 ± 0.78	19.44 ± 2.93[g]	15.80 ± 0.60
C18:1	0.62 ± 0.32	0.98 ± 0.24	0.94 ± 0.60	1.25 ± 0.22	1.74 ± 0.33	0.74 ± 0.74	1.52 ± 0.29	1.81 ± 0.44	1.68 ± 0.53
C18:1	1.41 ± 0.32	2.12 ± 0.32	2.31 ± 1.26	2.32 ± 0.83	1.98 ± 0.17	2.06 ± 0.06	1.61 ± 0.21	2.33 ± 0.28	1.95 ± 0.22
C18	33.25 ± 4.16	31.16 ± 8.22	31.49 ± 0.45	30.89 ± 0.13	29.24 ± 3.50	32.10 ± 3.03	28.37 ± 0.94	26.34 ± 1.40	29.19 ± 3.65
CLA[c]	0.46 ± 0.23	0.82 ± 0.09	1.21 ± 0.10[f]	0.77 ± 0.14	0.67 ± 0.06	0.83 ± 0.20	0.56 ± 0.04	1.13 ± 0.37	0.90 ± 0.03
C20	1.67 ± 1.55	0.26 ± 0.27	1.52 ± 1.09	0.38 ± 0.38	-	0.35 ± 0.35	-	-	-
cyc[d]	-	-	-	-	-	-	0.10 ± 0.10	0.20 ± 0.10	-
NI[e]	8.42 ± 2.50	5.13 ± 0.72	10.64 ± 1.52	2.75 ± 0.39	2.86 ± 0.04	4.58 ± 2.56	2.06 ± 0.15	1.63 ± 0.21	2.20 ± 0.29

[a] ácido linoleico; [b] ácido oleico; [c] ácido linoleico conjugado; [d] ácido lactobacilico; [e] no identificado; [f] $p<0.05$ comparado con el yogur control D1 (0% COS); [g] $p<0.001$ comparado con el yogur control D28 (0% COS).

Los porcentajes de CLA de los yogures frescos suplementados con COS 0.1% (día 1 de almacenamiento) fueron significativamente distintos

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de los yogures químicamente digeridos

COS (%)	0	0.1
C14:1	0.54 ± 0.04	0.18 ± 0.18
C14	7.27 ± 0.04	3.36 ± 1.47
C15	1.27 ± 0.06	0.43 ± 0.43
C16:1	2.54 ± 0.43	1.54 ± 1.54
C16:1	0.58 ± 0.14	0.40 ± 0.40
C16	33.85 ± 1.49	30.03 ± 1.53
C17	1.38 ± 0.74	0.23 ± 0.23
LA[a]	7.33 ± 1.77	8.98 ± 3.51
OLE[b]	13.68 ± 0.52	13.88 ± 2.19
C18:1	2.29 ± 0.19	1.46 ± 0.31

lábiles como el CLA se ven afectadas por la presencia de COS en entornos químicos que imitan los procesos gastrointestinales. En un trabajo previo (Rodríguez y Albertengo, 2005) se observó que quitosano producido a partir de desechos de camarón (el mismo que fue utilizado en este trabajo como materia prima para obtener los COS), inhibía la absorción duodenal los lípidos del alimento, favoreciendo su excreción. Este comportamiento se pudo explicar debido a la formación de flóculos de quitosano al pH duodenal (6,2) que retenían los lípidos en la digestión química. En cambio, en este trabajo se ha observado que un derivado del quitosano, el oligoquitosano, adicionado hasta concentraciones de 0.1% p/p en yogur, solo estaría disminuyendo la disponibilidad del CLA, pudiendo ser utilizado como ingrediente funcional en yogur.

4. Conclusiones

Las propiedades nutricionales y microbiológicas de los yogures no se modificaron a 0,1% p/p o a concentraciones más bajas de COS. Las concentraciones más altas causaron alteraciones metabólicas en las bacterias lácticas, evidenciadas por una disminución en la producción de ácido láctico. En consecuencia, los productos obtenidos con 0,5 y 3% de COS no cumplían con las normas definidas para el yogur por el Codex Alimentarius. Teniendo esto en cuenta, se podrían incorporar quitooligosacáridos (PM 2,7 kDa, DD 68%) en yogures a una concentración máxima de 0,1% p/p. Dado que las dosis requeridas para los ensayos clínicos oscilan entre el 1% y el 5% del total del alimento consumido por día, no sería posible incorporar tales cantidades de este compuesto en los yogures, sin afectar el proceso de la fermentación microbiana. Si se persigue un efecto promotor de la salud, se debe agregar la cantidad deseada de COS al yogur inmediatamente antes de su consumo. Con respecto a su uso como prebiótico y biopreservador, se podrían utilizar dosis de hasta 0,1% de COS sin causar inhibición metabólica de los fermentos iniciadores con mínima interferencia en la absorción de lípidos. Teniendo en cuenta el creciente interés en los beneficios del COS para la salud humana y la industria alimentaria, los resultados del presente estudio contribuyen a un mejor uso de estos oligosacáridos como ingrediente alimentario.

5. Referencias

Aam, B.B.; Heggset, E.B.; Norberg, A.L.; Sørlie, M.; Vårum, K.M.; Eijsink, V.G.H (2010). *Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine*, Marine Drugs (8), 1482–1517.

Association of Official Analytical Chemists (1984). Official methods of analysis, Washington, USA, 14th edn.

Association of Official Analytical Chemists (1995). Official methods of analysis, Arlington, USA, 13rd edn.

Baboota, R. K. y otros seis autores, (2013). *Functional Food Ingredients for the Management of Obesity and Associated Co-morbidities – A Review*, Journal of Functional Foods (5), 997–1012.

Baldrick, P. (2010). *The Safety of Chitosan as a Pharmaceutical Excipient*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 56(3), 290-299.

Beysseriat, M.; Decker E.A.; McClements D.J. (2006). *Preliminary Study of theInfluence of Dietary Fiber on the Properties of Oil-in-Water Emulsions Passing Through an In Vitro Human Digestion Model*, Food Hydrocolloids, (20) 800–809.

Chae, S.Y.; Jang, M.-K.; Nah, J.-W. (2005). *Influence of Molecular Weight on Oral Absorption of Water Soluble Chitosans*, Journal of Controlled Release (102), 383–394.

Codex Alimentarius (2003). Codex Standard for Fermented Milks, CODEX STAN 243-2003.

Dello Staffolo M.; Martino M.; Bevilacqua A.; Montero M.; Rodríguez MS.; Albertengo L. (2011). *Chitosan Interaction with Iron from Yoghurt Using an In Vitro Digestive Model: Comparative Study with Plant Dietary Fibers*, International Journal of Molecular Science (12), 4647-4660.

Hu, H. y otros ocho autores, (2021). *N-acetyl-chitooligosaccharide Attenuates Inflammatory Responses by Suppression of NF-κB Signaling, MAPK and NLRP3 Inflammasome in Macrophages*, Journal of Functional Foods (78), 104364.

Jeon, Y.-J.; Shahidi, F.; Kim, S.-K. (2000). *Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and their Applications in Physiological Functional Foods*, Food Review International (16), 159–176.

Ji, X.-G. y otros seis autores, (2021). *In vitro Fermentation of Chitooligosaccharides and their Effects on Human Fecal Microbial Community Structure and Metabolites*, LWT (144), 111224.

Laokuldilok T. y otros siete autores, (2017). *Physicochemical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Chitooligosaccharides Produced Using Three Different Enzyme Treatments*, Food bioscience (18), 28-33.

Liaqat, F; Eltem, R. (2018). *Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review*, Carbohydrate Polymers (184) 243–259.

Mukarram, M.; Naeem, M.; Aftab, T.; Masroor M.; Khan A. (2022). Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides: Recent Advances and Future Perspectives En Radiation-Processed Polysaccharides por M. Naeem, Tariq Aftab, M. Masroor, A. Khan, pp 339-353, Academic Press, Cambridge, Massachusetts. USA.

Naveed, M. y otros once autores, (2019). *Chitosan oligosaccharide (COS): An overview*, International

Journal of Biological Macromolecules (129), 827-843.

Nieva-Echevarría, B.; Goicoechea, E.; Manzanos M.J.; Guillén M.D. (2014). *A Method Based on ^{1}H NMR Spectral Data Useful to Evaluate the Hydrolysis Level in Complex Lipid Mixtures*, Food Research International (66), 379–387.

Rajabi, M. (2019). *Chitooligosaccharides in Food Industry*, Open Access Journal of Biomedical Science (1), 130-131.

Rodríguez, M.S.; Albertengo, L. (2005). *Interaction between Chitosan and Oil under Stomach and Duodenal Digestive Chemical Conditions*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 69(11), 2057–2062.

Rodríguez, M.S.; Montero, M.; Dello Staffolo, M.; Martino, M.; Bevilacqua A.; Albertengo L. (2008). *Chitosan Influence on Glucose and Calcium Availabilities from Yogurt: In Vitro Comparative Study with Plants Fibre*, Carbohydrate Polymers, (74), 797–801.

Roberts, G.A.F.; Domszy, J.G. (1982). *Determination of the Viscometric Constants for Chitosan*, International Journal of Biological Macromolecules (4), 374–377.

Terrile, M.C.; Mansilla, A.Y.; Albertengo, L.; Rodríguez, M.S.; Casalongué, C.A. (2015). *Nitric-Oxide-Mediated Cell Death is Triggered by Chitosan in Fusarium eumartii Spores*, Pest Manage Science (71), 668–674.

Wang, J.; Zhang, J.; Song, F.; Gui, T.; Xiang, J. (2015). *Purification and Characterization of Chitinases from Ridgetail White Prawn Exopalaemon carinicauda*, Molecules 20(2), 1955-1967.

Zhai, X.; Li, C.; Ren, D.; Wang, J.; Ma, C.; El-Aty, A.M.A. (2021). *The Impact of Chitooligosaccharides and their Derivatives on the In Vitro and In Vivo Antitumor Activity: A Comprehensive Review*, Carbohydrate Polymers (266), 118132.

04TCA - Impacto del uso de leche enriquecida con leche en polvo descremada y de cultivos adjuntos en los perfiles de maduración de queso Cremoso

Impact of the use of milk enriched with skim milk powder and adjunct cultures on the ripening profiles of Cremoso cheese

Paula Giménez[1], Guillermo Peralta[1], Mara Batistela[1], Guillermo George[1,2], Facundo Cuffia[1], Elisa Ale[1], Laura Spotti[3], Juan Pablo Quintero[3], M. Cristina Perotti[1,2], Erica Hynes[1,2], Carina Bergamini[1,2]

1. Instituto de Lactología Industrial (UNL/CONICET). 1ro de Mayo 3250, Santa Fe, Argentina.
2. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, UNL, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina.
3. Laboratorio de Estudios Fisicoquímicos de Alimentos. ITA – FIQ, UNL. Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina. paula.gimenez92@gmail.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar el impacto del uso de leche enriquecida con Leche en Polvo Descremada (LPD) y la utilización de dos fermentos adjuntos: *Lacticaseibacillus paracasei* L90 y *Lactobacillus rhamnosus* L73, en la elaboración y maduración de queso Cremoso. La incorporación de LPD a la leche de quesería permitió incrementar significativamente el rendimiento quesero y como consecuencia permite mejorar la capacidad operativa de la planta quesera. Esta estrategia afectó solamente algunas características de los quesos elaborados: incrementó el nivel de carbohidratos y algunos ácidos, generó un leve incremento de la masticabilidad y dureza y una pequeña disminución de la fusión, lo que probablemente sea consecuencia de una leve disminución de la proteólisis observada en estos quesos, y finalmente, no sólo no produjo defectos sensoriales, sino que incrementó la aceptabilidad de los productos. En relación a los fermentos adjuntos, ambas cepas se mantuvieron en elevados niveles en los quesos durante la maduración, lo que permite controlar las NSLAB (bacterias lácticas no provenientes del fermento) adventicias. Además, no generaron defectos de postacidificación o formación de ojos no deseados. La cepa L73 mostró un impacto beneficioso en la aceptabilidad de los quesos, mientras que L90 incrementó la peptidólisis y afectó la textura en forma diferencial en los quesos con o sin LPD.

Palabras clave: queso Cremoso, fermentos adjuntos, maduración, leche de quesería enriquecida, leche en polvo.

Abstract

In the present work, the impact of the use of milk enriched with skim milk powder by the addition of Skimmed Milk Powder (SMP) and the utilization of two adjunct cultures*: Lacticaseibacillus paracasei* L90 and *Lactobacillus rhamnosus* L73, on Cremoso cheese-making and ripening was evaluated. The incorporation of SMP into the cheese milk significantly increased the cheese yield and as a consequence allows improving the operating capacity of the cheese plant. This strategy affected only some characteristics of the cheeses: it increased the level of carbohydrates and some acids, produced a slight increase in cheese chewiness and hardness and a small decrease in the melting properties that is probably due to the slight decrease of proteolysis observed in these cheeses. Finally, the addition of SMP also increased the acceptability of the products. In relation to the adjunct cultures, high levels of both strains were maintained in the cheeses during ripening, which allows controlling adventitious NSLAB (non-starter lactic acid bacteria). Furthermore, no post-acidification defects or unwanted eye formation were produced. The L73 strain showed a beneficial impact on the acceptability of the cheeses, while L90 increased peptidolysis and affected the texture differentially in the cheeses with or without LPD.

Keywords: Cremoso cheese, adjunct cultures, ripening, enriched cheesemilk, milk powder.

1. Introducción

El agregado de polvos lácteos a la leche de quesería es una estrategia utilizada para estandarizar el nivel proteico y/o aportar propiedades tecnofuncionales como la mejora de la textura y la retención de agua. Sin embargo, esta práctica incrementa la cantidad de sustratos fermentables como lactosa y citrato, que podrían ser utilizados, tanto por los fermentos como por la flora adventicia. A su vez, el incremento del nivel de proteínas ocasiona cambios en las propiedades de coagulación (Guinee, *et. al.*, 1997) que hay que tenerlas en cuenta para ajustar el protocolo de elaboración. Los efectos mencionados podrían ocasionar modificaciones en los perfiles de maduración, que podrían derivar en la aparición de defectos de textura o sabor. Sin embargo, la información reportada acerca del efecto del enriquecimiento de la leche de quesería con polvos lácteos en la maduración de quesos es escasa (Shakeel-Ur-Rehman *et al*., 2003; Oh *et al*., 2014).

A su vez, durante las últimas dos décadas se ha popularizado el uso de fermentos adjuntos o de afinado en quesería con el objetivo de mejorar la calidad de los quesos. Estos fermentos están generalmente constituidos por lactobacilos mesófilos de origen no fermento, aislados de quesos de buena calidad y cuyas propiedades bioquímicas y tecnológicas han sido adecuadamente caracterizadas (Johnston *et al.,* 2010). De los fermentos adjuntos se espera que prosperen en el queso evitando la proliferación de NSLAB adventicias y potencialmente perjudiciales, que no produzcan ningún defecto y que, en lo posible, también aporten positivamente al flavour y la calidad del producto final (Broadbent *et al.,* 2011). La influencia de las NSLAB y fermentos adjuntos durante la maduración de quesos depende de sus actividades enzimáticas específicas. De esta manera, podrían tener un impacto en la peptidólisis, aumentando los aminoácidos libres y contribuyendo a controlar el defecto de sabor amargo, inducido por péptidos de carácter hidrofóbico; además, podrían participar en el catabolismo de aminoácidos aportando gran cantidad de compuestos de flavour (Yvon, 2006). Nuestros antecedentes, así como los reportados en la bibliografía en relación al uso de fermentos adjuntos en quesos, se han llevado a cabo en variedades tradicionales, mientras que no hay información de la performance de estos fermentos en quesos elaborados con leches enriquecidas en proteínas por el agregado de ingredientes lácteos.

En el INLAIN se han obtenido y caracterizado varias cepas de fermentos adjuntos. En particular, la cepa *Lacticaseibacillus paracasei* 90 (L90), fue ensayada con éxito en modelos de queso, y en quesos blandos, semiduros y duros en los que fue añadida como cultivo fresco o liofilizada luego de su crecimiento en un medio comercial (Milesi *et al.,* 2008, 2010, Peralta *et al.,* 2016, Cuffia, 2016, Peralta *et al.*, 2017), mientras que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 73 (L73) fue evaluada como cultivo fresco en queso blando y semiduro (Milesi *et al.*, 2008, 2009). Además, estas cepas se han caracterizado en cuanto a su perfil de actividades aminotransferasa y glutamatodeshidrogenasa, ya que son enzimas clave para el desarrollo de sabor en el queso (Peralta et. al., 2016). El objetivo del presente trabajo fue determinar el impacto del uso de leche enriquecida con Leche en Polvo Descremada (LPD) y la utilización de fermentos adjuntos en la elaboración y maduración de queso Cremoso.

2. Materiales y métodos

Diseño experimental

Se evaluó la influencia de dos factores (**F**) en la maduración de queso Cremoso: **F1**: adición de leche en polvo descremada de bajo tratamiento térmico (LPD) (La Serenísima, Buenos Aires) a la leche de elaboración; **F2**: adición de un fermento adjunto autóctono del cepario del INLAIN. El F1 se estudió a dos niveles: 1-con adición de LPD (**P**) y 2-sin adición de LPD (**C**). La concentración de proteína y materia grasa de las leches utilizadas fueron las siguientes respectivamente: leche control 3,30g% y 3,19 g% y leche enriquecida 4,71g% y 4,75g%. El F2 se estudió a tres niveles: 1- sin fermento, 2- con *Lacticaseibacillus paracasei* 90 (L90) y 3- con *Lactobacillus rhamnosus* 73 (L73). Las dos cepas autóctonas fueron crecidas a pH controlado (pH 6,5) en un medio optimizado a base de permeado de suero en el cual alcanzaron niveles de más de 9 log UFC/mL; el pellet celular fue liofilizado y almacenado a 4ºC hasta su uso en las elaboraciones (Batistela *et al.*, 2021). De esta manera, seis tipos de queso Cremoso fueron elaborados que se rotularon como: **C**, **C90**, **C73**, **P**, **P90** y **P73**.

Elaboración de quesos Cremoso

Los quesos fueron elaborados por triplicado en la planta piloto del INLAIN utilizando leche cruda provista por una empresa láctea cercana (Milkaut, Santa Fe). Para cada queso se utilizaron 30 L de leche, que fue pasteurizada (65ºC-30min) y estandarizada (materia grasa/proteína: 1,1) antes de la elaboración. Se adicionaron el fermento primario y los adjuntos (a un nivel de 10^6 UFC/mL), según corresponda, previamente resuspendidos en leche durante 10 min. El

coagulante (Chymax, Chr. Hansen) fue adicionado 30 min después del agregado del fermento y cuando la cuajada alcanzó la firmeza adecuada, fue cortada en granos de 5 mm^3 aproximadamente. El protocolo de elaboración de los quesos con leche concentrada se ajustó en base a los resultados obtenidos en un trabajo previo acerca de la influencia del agregado de leche en polvo en los parámetros de coagulación (Giménez, *et al*., 2021). En los quesos con adición de LPD (quesos P, P90 y P73), se realizó un lavado de la cuajada (20%) con el objetivo de disminuir el nivel de lactosa que se incrementa por la adición del polvo. Una vez alcanzada la humedad de grano deseada, la cuajada se moldeó y los quesos se acidificaron hasta pH 5,3 en cámara a 40ºC, luego de lo cual se salaron por inmersión en salmuera (20% p/v, pH 5,4, 4ºC) a razón de 1 h/kg. Los quesos se orearon a 4-6ºC durante 5 días, se envasaron al vacío y se maduraron durante 30 días a 4°C.

Análisis de los quesos

Rendimiento, composición global y pH

Se determinó el rendimiento de cada elaboración mediante la determinación del peso de la cuajada luego del salado. El rendimiento fue calculado como la relación porcentual del peso total de la cuajada y el volumen de leche utilizada (Guinee, *et al.,* 2006). Se analizó la composición global (humedad, materia grasa y proteínas) y el pH mediante métodos normalizados: pH (Bradley *et al.*, 1993), sólidos totales (ISO 5534|IDF 004:2004), grasa (ISO 3433|IDF 222:2008), y proteínas (ISO 8968-1/IDF 20-1:2011). La composición global fue determinada a los 12 días de elaboración, mientras que el pH fue evaluado a 0, 12 y 30 días.

Carbohidratos y ácidos orgánicos

Los niveles de lactosa, galactosa y ácidos orgánicos (cítrico, acético, láctico, orótico, hipúrico) fueron analizados por HPLC según Peralta *et al.* (2017) a los 0, 12 y 30 días de maduración.

Perfiles peptídicos

El seguimiento de la proteólisis se realizó mediante el análisis de los perfiles peptídicos por HPLC de fase reversa (Hynes *et al.*, 2003) a los 0, 12 y 30 días de maduración.

Recuentos microbiológicos

Se tomaron muestras de queso a los 12 y 30 días de maduración para los análisis microbiológicos mediante recuento en placa. Se determinaron los niveles del starter (*Streptococcus thermophilus*), de los cultivos adjuntos (L90 y L73) en APC leche y MRS agar pH 5,4, respectivamente (37°C, 48h, en condiciones microaerofílicas). Este último medio también se utilizó para evaluar NSLAB en los quesos sin adición de cultivos adjuntos (C y P). El nivel de bacterias coliformes fue analizado en VRBL (agar violeta rojo bilis) (32°C, 24h).

Perfil de textura y capacidad de fusión

El perfil de textura se determinó a los 30 días de maduración en una máquina universal de ensayos INSTRON Modelo 3344 USA, utilizando como dispositivo para realizar la compresión una base y una placa de compresión de 9 y 6 cm de diámetro respectivamente (Casa-Aléncaster, 2005). El ensayo se llevó a cabo realizando dos ciclos de compresión a un nivel de deformación del 30%. Las muestras se tomaron con un sacabocados, resultando cilindros de 28 mm de diámetro y 16 mm de altura. Se utilizó una fuerza de contacto de 0,05 N, a una velocidad de 1 mm/s y un tiempo de espera entre el primer y el segundo ciclo de 5 s. A partir de la curva fuerza-tiempo se obtuvieron los siguientes parámetros de textura: dureza, índice de recuperación elástica instantánea (IREI), índice de recuperación elástica retardada (IRER), masticabilidad, cohesividad, resiliencia y adhesividad. Por otro lado, también se determinó la capacidad de fusión como el incremento del área de un cilindro de queso (28 mm diámetro y 16 mm de altura) por calentamiento en estufa (130°C durante 15 minutos), utilizando una modificación del test de Schreiber (Muthukumarappan *et al.*, 1999). Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su análisis. Luego del calentamiento, las muestras se enfriaron a 4°C y se tomaron imágenes de las mismas mediante un escáner. Las áreas del queso antes y luego del calentamiento fueron calculadas mediante el software de dominio público Image J. Los ensayos de textura y fusión se realizaron al menos por duplicado.

Análisis sensorial

Las pruebas se llevaron a cabo en un laboratorio sensorial, en cabinas individuales, diseñadas de acuerdo a la norma ISO 8589 (2007). Se controló la luz del día artificial, la temperatura constante (22°C) y la circulación del aire. Un total de 103 consumidores fueron reclutados de la base de datos del Departamento de Análisis Sensorial de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) en función de su consumo de quesos (al menos una vez a la semana), disponibilidad e

interés por participar. Los participantes tenían entre 18 y 60 años y el porcentaje de mujeres fue del 62%. Los consumidores no recibieron ninguna información adicional sobre las muestras antes de la degustación y dieron su consentimiento informado por escrito. Se pidió a los consumidores que probaran las muestras y que codifiquen su gusto general (aceptabilidad) utilizando una puntuación hedónica horizontal; en donde: 9 = me gusta muchísimo; 8 = me gusta mucho; 7 = me gusta; 6 = me gusta poco; 5 = me resulta indiferente; 4 = me disgusta poco; 3 = me disgusta; 2 = me disgusta mucho; y 1 = me disgusta muchísimo (Ares *et al.*, 2017). Los anclajes verbales de la escala se seleccionaron para que la distancia psicológica entre los puntos sucesivos de la escala sea igual (Wichchukit & O´Mahony, 2014).

Análisis estadístico

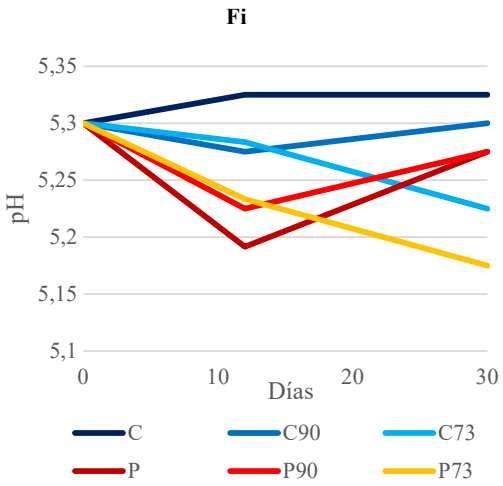
Los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos vías (p=0,05) para determinar la influencia de los dos factores estudiados (F1 y F2, ver diseño experimental) en los parámetros evaluados. Las diferencias entre medias se determinaron mediante el test de Tukey. Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab 18 Statistical Software (Minitab Inc., State College, PA, USA).

3. Resultados y Discusión

Rendimiento, composición global y pH

La incorporación de LPD incrementó el rendimiento quesero en las elaboraciones (p<0,05). El rendimiento de los quesos elaborados con la leche control (C, C90 y C73) fue de 13,1±0,7%, mientras que el obtenido para los quesos elaborados con leche enriquecida (P, P90 y P73) fue de 19,2±0,5%. De esta manera, la estrategia utilizada permitió incrementar el rendimiento quesero en casi un 50%. El mayor rendimiento se correlacionó con el incremento de sólidos lácteos en la leche enriquecida, la cual contenía niveles de materia grasa y proteínas aprox. 47% mayor que en la leche control.

Los valores de pH (Figura 1) y de composición global: proteínas (%P), materia grasa (%G) y humedad (%H) (Tabla 1), estuvieron dentro de los valores esperados para este tipo de quesos y no se observaron diferencias significativas en ningún caso (p>0,05). A los 30 días de maduración, se puede observar una leve tendencia de menores pH en los quesos con la cepa L73. Sin embargo, los niveles finales estuvieron en el rango normal para este queso.



gura 1. Evolución del pH de los quesos a lo largo de la maduración.

Los resultados obtenidos reflejan que ninguno de los dos factores estudiados tuvo un impacto en la composición y pH de los quesos y que las estrategias evaluadas no condujeron a la aparición de defectos tales como elevada post-acidificación o formación de ojos debido a la fermentación de carbohidratos residuales o citrato por las NSLAB o adjuntos. Estos defectos pueden ser ocasionados por fermentos primarios o adjuntos muy acidificantes o cepas gasógenas, respectivamente (Giménez *et al.*, 2021).

Tabla 1. Composición global de los quesos.

Quesos	%H	%G	%P
C	52,9 ± 1,5	25,5 ± 1,8	19,1 ± 0,3
C90	52,0 ± 0,2	25,1 ± 0,9	20,4 ± 1,8
C73	50,8 ± 1,1	26,1 ± 1,0	20,6 ± 0,13
P	51,5 ± 0,5	25,8 ± 0,5	20,2 ± 0,04
P90	51,5 ± 0,1	25,2 ± 0,3	20,8 ± 0,5
P73	51,1 ± 0,4	25,8 ± 0,2	20,6 ± 0,06

Recuentos microbiológicos

El starter se mantuvo en niveles similares, alrededor de 9,6 log UFC/g, en todos los quesos. Asimismo, las bacterias coliformes se encontraron en niveles menores a los máximos establecidos en la legislación nacional (<4 log UFC/g). Ninguno de los factores estudiados tuvo una influencia significativa en el nivel de starter y coliformes (datos no mostrados).

En cuanto a los fermentos adjuntos (Figura 2), ambas cepas alcanzaron niveles entre 7,4 y 8,0 log UFC/g, tanto en los quesos C como en los P, y se mantuvieron sin cambios durante la maduración. De esta manera, se corroboró una excelente viabilidad de los fermentos adjuntos autóctonos, crecidos en medios de cultivo

optimizados en el INLAIN y posteriormente liofilizados. Además, la incorporación de LPD no afectó la viabilidad de ninguna de las dos cepas evaluadas.

En los quesos sin adición de fermentos adjuntos, se observaron niveles de NSLAB entre 2,4 y 4,2 log UFC/g, los cuales fueron significativamente ($p<0,05$) mayores en los quesos P, demostrando un efecto de la incorporación de LPD en el crecimiento de este grupo microbiano adventicio. Estos resultados se pueden correlacionar con el incremento de nutrientes fermentables aportado por la LPD (ver siguiente ítem de carbohidratos y ácidos orgánicos), los que pueden ser utilizados por la flora NSLAB para su crecimiento y la potencial aparición de defectos relacionados a su actividad metabólica específica. Sin embargo, en un trabajo previo hemos corroborado que, más allá de la presencia de una microflora alterante, es crucial el mantenimiento de una correcta cadena de frío durante el almacenamiento y comercialización de los productos para evitar el desarrollo de defectos por la flora adventicia presente (Giménez *et al.*, 2021). En el presente trabajo, los quesos fueron mantenidos a 4-6ºC durante toda la maduración.

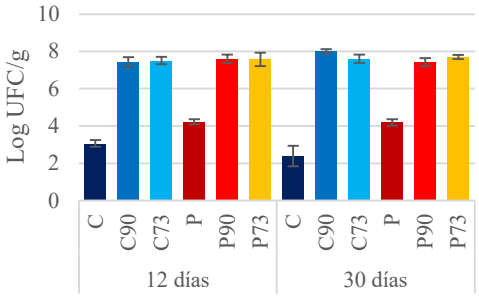


Figura 2. Evolución de la población de los cultivos adjuntos (L90 y L73) y de NSLAB en los quesos sin adición de adjunto (C y P). Se presentan los valores medios ± desviación estándar.

Carbohidratos y ácidos orgánicos

En la Figura 3 se presentan los resultados de carbohidratos y ácidos orgánicos en los quesos durante la maduración. La adición de LPD incrementó significativamente ($p<0,05$) en los quesos el nivel de compuestos presentes en este polvo: lactosa y los ácidos cítrico y orótico. Asimismo, la galactosa, que se produce a partir de la lactosa por la actividad acidificante del starter *S. thermophilus* y que se acumula en este tipo de queso debido a que el starter empleado no tiene la habilidad de fermentarla, también mostró mayores valores en los quesos con LPD a los 12 y 30 días de maduración. El ácido láctico también se incrementó en los quesos con LPD a los 12 días, probablemente debido al mayor nivel de carbohidratos fermentables. Sin embargo, el nivel de este ácido fue similar en todos los quesos al final de la maduración.

El F2 no tuvo influencia significativa en los niveles de los azúcares ni del ácido cítrico, lo que demuestra que ninguna de las dos cepas de fermentos adjuntos evaluadas tuvo la habilidad de metabolizar en forma significativa estos compuestos en los quesos. Sin embargo, en otros modelos de queso, estas cepas han mostrado un efecto diferente (Peralta y col., 2016; Cuffia, 2016), lo que refleja la influencia de la matriz en la actividad metabólica microbiana. En el presente trabajo, es probable que la presencia de altos niveles de carbohidratos residuales, sobre todo en los quesos con LPD, haya inhibido la capacidad de L90 y L73 de metabolizar el citrato. En efecto, ha sido demostrado que el nivel de carbohidratos presentes puede afectar la capacidad de lactobacilos mesófilos de metabolizar este ácido (Medina de Figueroa, *et. al*., 2000).

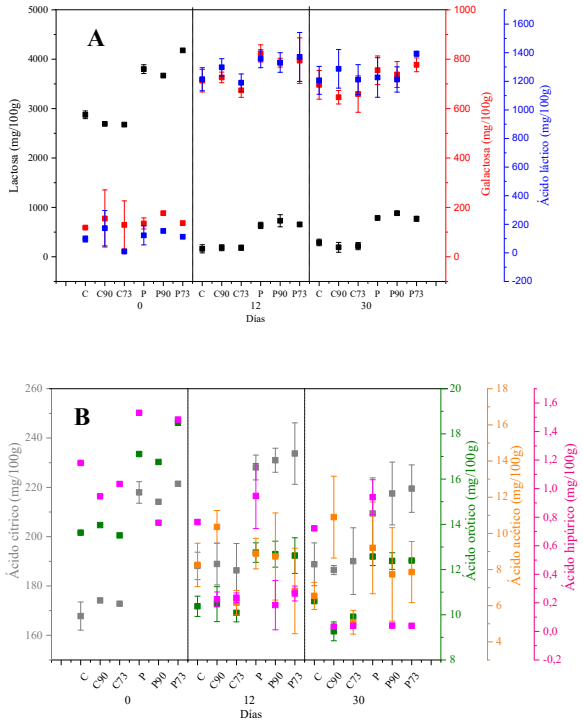


Figura 3. Carbohidratos y ácidos orgánicos en los quesos a 0, 12 y 30 días de maduración. A- Lactosa, galactosa y ácido láctico, B-Ácidos: cítrico, acético, orótico e hipúrico. Se presentan los valores medios ± desviación estándar, expresados en mg/100 g queso.

Por otro lado, el fermento adjunto sí mostró un impacto en los niveles de ácido hipúrico, el cual disminuyó significativamente en los quesos con

las cepas L90 y L73, demostrando la capacidad de las mismas de usar este compuesto para su crecimiento. Se ha reportado que el metabolismo de este ácido por las bacterias lácticas puede generar ácido benzoico, el cual es un agente conservante. Esta actividad metabólica ha sido demostrada previamente para un cultivo liofilizado de la cepa L90 luego de su crecimiento en un medio comercial, y adicionada en queso Cremoso miniatura (Giménez *et al.*, 2021). Asimismo, se observó un efecto del adjunto en el nivel de orótico, sólo al final de la maduración, siendo menores los valores para los quesos con Lp90. En relación al ácido acético, los niveles fueron mayores en los quesos con L90 que en los sin adjunto solamente a los 12 días de maduración, mientras que no hubo diferencias en este ácido en los quesos al final de la maduración.

Perfiles peptídicos

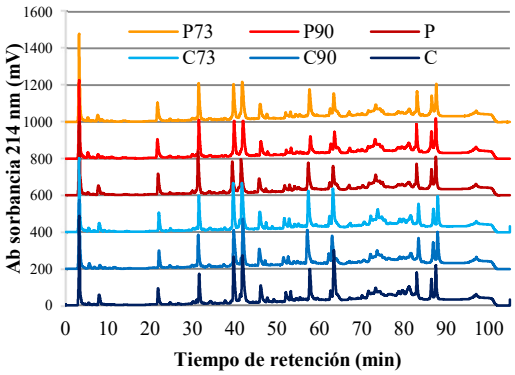


Figura 4. Perfiles peptídicos obtenidos por HPLC de una réplica de los quesos a los 30 días de maduración

Los perfiles peptídicos de las cuajadas (0 días) presentaron muy pocos picos, mientras que los quesos a los 12 y 30 días de maduración mostraron un perfil más complejo con un mayor número y tamaño de picos, reflejando el avance típico de la proteólisis durante la maduración. En la Figura 4 se presentan los perfiles de una de las réplicas de elaboración a los 30 días de maduración, que fueron similares a los de las otras réplicas.

Los cromatogramas se evaluaron visualmente y se observaron diferencias debido a ambos factores estudiados. En particular, la incorporación de LPD produjo una disminución de los picos que eluyen alrededor de los 40 min y de los 58-64 min, y un aumento del pico que eluye alrededor de los 30 min.

Por otro lado, la adición de los fermentos adjuntos también tuvo un impacto en estos perfiles, lo que demuestra la actividad peptidolítica de los mismos. En este sentido, se observó que la cepa L90 disminuyó la altura de los picos con tiempo de retención alrededor de 9 y 64 min, e incrementó un pico inicial que eluye aprox a los 5 min. La cepa L73 demostró un efecto menor con leve incremento principalmente de este pico inicial.

La proteólisis es un evento importante en este tipo de queso, con gran influencia en la textura y flavour. Durante este proceso se hidrolizan proteínas y péptidos grandes incrementando el número y nivel de péptidos medianos y pequeños y aminoácidos libres. Cada pico que se observa en los perfiles corresponde a un péptido o grupo de péptidos similares; los perfiles a distintos tiempos durante la maduración reflejan el complejo equilibrio entre su producción y su posterior degradación a aminoácidos (Pripp, *et al*., 2000). En general, debido a las características del método HPLC utilizado, los péptidos más hidrofílicos, incluidos los aminoácidos libres, salen en la primera parte del cromatograma, mientras que los más hidrofóbicos salen más tardíamente. En el queso Cremoso es normal el incremento de la mayor parte de los picos a lo largo del cromatograma como consecuencia de la proteólisis durante la maduración. Sin embargo, también es normal que algunos picos disminuyan durante este proceso lo que refleja su hidrólisis para dar otros péptidos (Milesi, 2009). Teniendo esto en cuenta, los resultados obtenidos reflejan una leve disminución de la proteólisis debido a la incorporación de LPD. Es importante destacar que uno de los agentes proteolíticos más importantes que actúa durante la maduración es la enzima coagulante residual. En los quesos elaborados, se utilizó una misma dosis de coagulante por volumen de leche, tanto en los quesos con o sin LPD. Esto origina que el nivel de coagulante por unidad de caseína sea menor en los quesos con LPD, lo que probablemente afectó el nivel residual de la misma en los quesos, conduciendo al efecto observado.

En relación a la incorporación de cultivos adjuntos, la influencia de los mismos en la proteólisis es debido a su actividad peptidolítica que produce en general un incremento del nivel de péptidos pequeños y aminoácidos libres (McSweeney, 2004). El incremento del pico inicial observado para los quesos con adjuntos, principalmente para la cepa L90, refleja un leve impacto de las peptidasas de los fermentos evaluados en la peptidólisis.

Perfil de textura y capacidad de fusión

Los parámetros de dureza y masticabilidad fueron afectados por los factores estudiados (Tabla 2). En particular, se observó una influencia significativa de la interacción de ambos factores en la dureza, la cual fue mayor en P90 y menor en C90. La dureza en los otros quesos mostró valores intermedios. Por otro lado, el F1 mostró un impacto en la masticabilidad, incrementándose la misma debido a la adición de LPD.
Los otros parámetros de textura evaluados no fueron afectados por los factores estudiados y mostraron los siguientes rangos de valores: IREI: 0,29-0,38; IRER: 0,35-0,38; Cohesividad: 0,64-0,68; Resiliencia: 0,30-0,38; Adhesividad (J): 0,73-2,98.

Tabla 2. Resultados del análisis de textura (dureza y masticabilidad) y análisis sensorial (aceptabilidad) de los quesos a los 30 días de maduración (valores medios ± desviación estándar).

		Dureza (N)	Masticabilidad (N)	Aceptabilidad
Quesos	C	8,6±1,5 ^{CD}	2,0±0,2^{A}	6,9±1,1^{Ab}
	C90	6,4±0,3 ^{D}	1,6±0,2 ^{A}	7,1±0,9^{Aab}
	C73	10,0±1,5^{CD}	2,3±0,2 ^{A}	7,6±0,9^{Aa}
	P	10,5±1,5 ^{CD}	2,6±0,4 ^{B}	7,2±1,1^{Bb}
	P90	11,5±1,9 ^{C}	2,6±0,3 ^{B}	7,3±0,9^{Bab}
	P73	9,9±1,0^{CD}	2,3± 0,4 ^{B}	7,4±1,1^{Ba}
Significancia	F1	*	*	*
	F2	NS	NS	*
	F1xF2	*	NS	NS

^{A,B} Valores con diferente superíndice en una columna difieren significativamente (p<0,05) para F1.
^{a,b} Valores con diferente superíndice en una columna difieren significativamente (p<0,05) para F2.
^{C,D} Valores con diferente superíndice en una columna difieren significativamente (p <0,05) para F1 × F2.

Por otro lado, la capacidad de fusión de los quesos (Figura 5) no fue afectada por ninguno de los factores estudiados (p>0,05). Sin embargo, se observó una tendencia a una leve disminución de la fusión en los quesos adicionados de LPD.

La proteólisis de los quesos Cremoso tiene una influencia significativa en las propiedades de fusión y en los parámetros de textura (Hynes, *et al.,* 1999). Los resultados de proteólisis se correlacionan con los de textura y fusión. En general, menor nivel de proteólisis condujo a un incremento en la masticabilidad y dureza y una leve menor fusión.

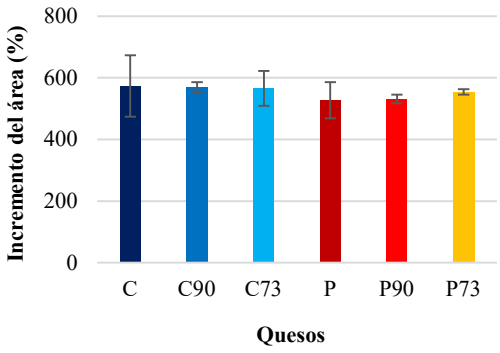


Figura 5. Incremento porcentual del área de un cilindro de queso sometido a calentamiento en estufa. Se presentan los valores medios ± desviación estándar.

Análisis sensorial

Se encontraron diferencias significativas en la aceptabilidad de los quesos elaborados de acuerdo a ambos factores estudiados. Como puede observarse en la Tabla 2, los resultados del gusto general fueron mayores (p<0,05) para los quesos con LPD y para los quesos adicionados de la cepa 73. La adición de la cepa L90 no tuvo efecto en la aceptabilidad, resultando los valores similares a los quesos sin adjunto. Si bien no se observó un efecto positivo de esta cepa en el gusto general, tampoco generó defectos que afecten negativamente la aceptabilidad de los quesos.

Los resultados obtenidos reflejan un impacto positivo de las estrategias evaluadas en la aceptabilidad de los quesos.

4. Conclusiones

La incorporación de LPD a la leche de quesería permite incrementar la capacidad operativa de una planta quesera y afecta sólo levemente algunas características de los quesos elaborados. En particular, el uso de leche enriquecida incrementó el nivel de carbohidratos y algunos ácidos; también produjo un incremento en el nivel de las NSLAB, que se mantuvo igualmente en niveles bajos (~4,3 log UFC/g) y no sólo no produjo defectos sensoriales, sino que incrementó la aceptabilidad de los productos. Asimismo, la adición de LPD generó un leve incremento de la masticabilidad y dureza y una pequeña disminución de la fusión, lo que probablemente sea consecuencia del impacto observado en la

proteólisis, la cual fue levemente menor en estos quesos.

Por otro lado, los fermentos adjuntos evaluados fueron capaces de mantener una elevada viabilidad en los quesos durante la maduración, lo que permite por competencia controlar el desarrollo de NSLAB adventicias. Además, la cepa L73 mostró un impacto beneficioso en la aceptabilidad de los quesos, mientras que la cepa L90 incrementó la peptidólisis y afectó la textura en forma diferencial en los quesos con o sin LPD. Finalmente, debido a la ausencia de influencia en los perfiles de fermentación, los adjuntos no ocasionaron defectos de postacidificación o formación de ojos no deseados.

5. Referencias

Ares, G., Alcaire, F., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., & Catsura, J. (2017). *Identification of drivers of (dis) liking based on dynamic sensory profiles: Comparison of Temporal Dominance of Sensations and Temporal Check-all- that-apply.* Food Research International, 92, 79-87.

Batistela, M. E.; Peralta, G.H.; Ale, E.C.; Wolf, V.I.; Hynes, E.R.; Bergamini, C.V. (2021). *Producción de fermentos: optimización, validación y caracterización de un medio de cultivo formulado a base de permeado de suero de queso.* V Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, 15 al 17 septiembre de 2021.

Bradley, R. L.; Arnold, E.; Barbano, D. M.; Semerad, R. G.; Smith, D. E. and Vines, B. K. (1993). *Chemical and physical methods. In Standard methods for the examination of dairy product*, 433-53. Marshall R, ed. Washington: American Public Health Association.

Broadbent, J.R.; Budinich, M.F.; Steele, J.L. (2011). *"Cheese | Non-Starter Lactic Acid Bacteria".* In: Fuquay J, Fox PF, McSweeney PLH (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences, Second edition (639-644). Academic Press, UK.

Casas-Alencáster, N. B.; Pardo-García, D. G. (2005) *Análisis de perfil de textura y propiedades de relajación de geles de mezclas almidón de maíz ceroso entrecruzado-gelana*, Revista Mexicana de Ingeniería Química, 4 (1), 107-121. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa Distrito Federal, México.

Cuffia F. (2016) *Biogeneración de aroma por fermentos primarios y adjuntos de bacterias lácticas en quesos duros*. Tesis de Doctorado en Tecnología Química. Universidad Nacional del Litoral.

Giménez, P.; Perotti, M.C.; George, G.; Spotti, M.L.; Quintero, J.P.; Caballero M.S.; Hynes, E.R.; Bergamini, C.V. (2021). *Queso cremoso elaborado con leche adicionada de leche en polvo.* 6to Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos, Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

Guinee, T.P.; Gorry, C.B.; O'Callaghan, D.J.; O'Kennedy, B.T.; O'Brien, N.; Fenelon, M.A. (1997). *The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. International.* Journal of Dairy Technology. 50 99–106.

Guinee, T.P.; O'Kennedy, B.T.; Kelly P.M. (2006). *Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese.* Journal of Dairy Science, 89, 468-482

ISO (2004). *Cheese and processed cheese – determination of the total solids content.* (Reference method). ISO 5534-IDF 4. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

ISO (2007). *Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms.* ISO Standard 8589. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

ISO (2008). *Cheese – determination of fat content – Van Gulik method*. ISO 3433-IDF 222. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

ISO (2011). *Milk and milk products – determination of nitrogen content – part1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*. ISO 8968-IDF 20. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

Johnston, K.A.; Barclay, A.B.; Honoré, C. (2010). *A brief history of innovation in New Zealand cheesemaking.* Australian Journal of Dairy Technology, Special issue: Cheese science 2010 Proceedings, 65, 122-127.

Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (1999). *Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheese.* Australian Journal of Dairy Technology. 54, 24-27.

Hynes, E. R.; Bergamini, C. V.; Suárez, V. B. and Zalazar, C. A. (2003). *Proteolysis on Reggianito Argentino Cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of Lactobacillus helveticus.* Journal of Dairy Science, 86, 3831-3840.

Medina de Figueroa, R.; Álvarez, E.; Pesce de Ruiz Holgado, A.; Oliver, G. y Sesma, E. (2000). *Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli*. Microbiological Research, 154, 313−320.

McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology,* Vol. 1: General Aspects; Cap. 14.2: Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate (Eds.: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. y Guinee, T.). Academic Press, Estados Unidos, pág. 361-371.

Milesi, M.M.; McSweeney, P.L.H.; Hynes, E. (2008). *Impact of Chymosin- and Plasmin-mediated Primary Proteolysis on the Growth and Biochemical Activities of Lactobacilli in Miniature Cheddar-type Cheeses*. Journal of Dairy Science, 91, 3277-3290.

Milesi, M. M. (2009). Desarrollo de fermentos adjuntos para quesería a partir de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Milesi, M.M.; Wolf, V.; Bergamini, C.V.; Hynes, E.R. (2010). *Two strains of non-starter lactobacilli increased the production of flavour compounds in soft cheeses*. Jorunal of Dairy Science, 93, 5020-5031.

Muthukumarappan, K.; Wang, Y.C. and Gunasekarant, S. (1999). Short Communication: *Modified Schreiber Testfor Evaluation of Mozzarella Cheese Meltability.* Journal of Dairy Science, 82, 1068-1071.

Oh, S.; Lee, H.; Myung, J.; Joung, J.; Lee, J.; Shin, Y.; Baick, S. (2014). *Effects of temperature and supplementation with skim milk powder on microbial and proteolytic properties during storage of Cottage Cheese*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 24 (6), 795-802.

Peralta, G.H.; Wolf, I.V.; Perotti, M.C.; Bergamini, C.V.; Hynes, E.R. (2016). *Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptoccocci cultures in a cheese extract.* Dairy Science and Technology, 96, 603-621.

Peralta, G. H.; Bergamini, C. V.; Audero, G.; Páez, R.; Wolf, V. I.; Perotti, M. C.; Hynes, E. R. (2017). *Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 255, 17-24.

Pripp, A. H.; Stepaniak, L. y Sørhaug, T. (2000). *Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening*. International Dairy Journal.10, 249-253.

Shakeel-Ur-Rehman, Farkye, N.Y.; Considine, T.; Schaffner, A.; Drake, M.A. (2003). *Effects of standardization of whole milk with dry milk protein concentrate on the yield and ripening of reduced-fat Cheddar cheese*. Journal of Dairy Science, 86, 1608-15.

Wichchukit, S., & O´Mahony, M. (2014). *The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: some reappraisals and alternatives*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95 (11), 2167-2178.

Yvon, M. (2006). *Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria.* Australian Journal of Dairy Technology 61, 16-24.

05TCA - Inhibición de la precipitación del L-lactato de calcio por el Caseinomacropéptido a pH neutro

Inhibition of calcium L-lactate precipitation by Caseinomacropeptide at neutral pH

Karina Gabriela Loria[1,2], Malena Espósito[1], Ana M.R. Pilosof[2,3], María Edith Farías[1,4]*

1. Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Ruta 5 y 7, Luján, Bs. As., Argentina.
2. 2 CONICET.
3. 3 ITAPROQ-CONICET. Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
4. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA).
*Correo electrónico de contacto: efarias@unlu.edu.ar

Resumen

Las sales de calcio presentan menor solubilidad a pH neutro o básico. Así existe una correlación directa entre la solubilidad y la bioaccesibilidad que se define como la fracción soluble de un compuesto que se libera del quimo en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, está disponible para su absorción intestinal. El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido con valiosas propiedades bioactivas, obtenido durante la elaboración del queso, que se une con calcio iónico en una relación 1,2 milimoles de Ca^{2+}/g. El lactato de calcio (Lac_2Ca) es una sal de uso terapéutico que se administra en forma oral y parenteral para corregir la hipocalcemia. El objetivo de este trabajo fue investigar la inhibición de la precipitación del Lac_2Ca por la presencia del CMP a pH neutro a 5, 10 y 20 °C y estudiar la actividad y concentración de las especies que intervienen en su equilibrio de disolución. Los resultados indicaron que la presencia de CMP aumentó la solubilidad del Lac_2Ca a 20ºC, pero la disminuyó a 5 y 10 °C. También se determinó electroquímicamente la concentración de las especies $[CaL^+]$, $[Ca^{2+}]$ y $[L^-]$ que intervienen en su equilibrio de disolución. Los resultados mostraron que el CMP tiene más afinidad con el $[CaL^+]$ que con el $[Ca^{2+}]$, a 20 °C. Por otro lado, a 20 ºC, el CMP aumentó la solubilidad principalmente interactuando con el $[CaL^+]$. La sobresaturación de Lac_2Ca en presencia de CMP podría ayudar a optimizar la bioaccesibilidad de suplementos dietarios que utilicen esta sal.

Palabras clave: Caseinomacropéptido, L-lactato de calcio, bioaccesibilidad, sobresaturación.

Abstract

Calcium salts have less solubility at neutral or basic pH. Thus, there is a direct correlation between solubility and bioaccessibility defined as the soluble fraction of a compound that is released from the chyme in the gastrointestinal tract and is therefore available for intestinal absorption. Caseinomacropeptide (CMP) is a peptide with valuable bioactive properties, obtained during cheese making, which can bound ionic calcium in a ratio of 1.2 millimoles of Ca^{2+}/g. Calcium lactate (Lac_2Ca) is a salt for therapeutic use that is administered orally and parenterally to hypocalcemia correction. The objective of this work was to investigate the inhibition of Lac_2Ca precipitation by the presence of CMP at neutral pH at 5, 10 and 20 °C and study the activity and concentration of the species that intervene in its dissolution equilibrium. The results indicated that the presence of CMP increased the solubility of Lac_2Ca at 20°C, but decreased it at 5 and 10° C. The concentration of $[CaL^+]$, $[Ca^{2+}]$ and $[L^-]$ species that intervene in their dissolution equilibrium was also electrochemically determined. The results showed that CMP has more affinity for $[CaL^+]$ than for $[Ca^{2+}]$, at 20 ° C. On the other hand, at 20 ºC, CMP increased solubility mainly by interacting with $[CaL^+]$. The supersaturation of Lac_2Ca in the presence of CMP could help to optimize the bioavailability of dietary supplements that use this salt.

Keywords: Caseinomacropeptide, calcium L-lactate, bioaccesibility, supersaturation.

1. Introducción

Las sales de calcio presentan menor solubilidad a pH neutro o básico, que es el pH del intestino en donde se produce casi la totalidad de la absorción del mineral (Eckert et al. 2014). Así existe una correlación directa entre la solubilidad la bioaccesibilidad que puede definirse como la fracción soluble de un compuesto que se libera del quimo en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, está disponible para su absorción intestinal (generalmente basada en procedimientos *in vitro*) (Burgos et al. 2018). Está bien establecido que, aunque la cantidad total de un nutriente es potencialmente bioaccesible, muy pocos se convierten completamente en su forma soluble para su absorción durante la digestión. La absorción de calcio ocurre a nivel intestinal por dos mecanismos: uno saturable (regulado por la Vitamina D) y otro no saturable. Aunque los dos mecanismos son diferentes, la absorción de calcio depende del calcio libre, la cual está afectada por la precipitación con carbonatos, oxalatos, fitatos o fosfatos.

La unión de calcio a moléculas orgánicas como los péptidos pueden prevenir la precipitación del calcio. El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido con valiosas propiedades bioactivas, obtenido durante la elaboración del queso, que se une al calcio iónico en una relación 1,2 milimoles de Ca^{2+}/g (Loria 2020). Por otro lado, el lactato de calcio es una sal de uso terapéutico que se administra en forma oral y parenteral para corregir la hipocalcemia. Es una excelente fuente de ion calcio para el tratamiento oral de sus deficiencias y para la prevención de la osteoporosis (Gerhard 2002). El lactato, así como otros hidroxicarboxilatos (gluconato, citrato, acetato o lactobionato) pueden formar soluciones fuertemente sobresaturadas en condiciones isotérmicas y biológicamente relevantes (pH neutro a alcalino). La sobresaturación de ciertas sales de calcio podría ser la clave del mecanismo para incrementar la biodisponibilidad de hidroxicarboxilatos de calcio, como el L-lactato de calcio, el D-gluconato de calcio y el citrato de calcio (Garcia et al. 2018). De acuerdo con esto, el objetivo de este trabajo fue investigar la inhibición de la precipitación de lactato de calcio por la presencia del CMP (fenómeno que se denomina sobresaturación) y estudiar la actividad y concentración de las especies que intervienen en su equilibrio de disolución. Entender la interacción entre el calcio con algunos de los iones presentes en la leche (en este caso lactato) y el CMP, no solamente es importante desde el punto de vista nutricional, sino también por su aplicación tecnológica, por ejemplo, para evitar la formación de incrustaciones en cañerías y depósitos. Además, la sobresaturación del lactato de calcio en quesos de larga maduración podría ser una solución al problema tecnológico de algunos quesos coloreados, como el Cheddar, los cuales presentan manchas blancas por la precipitación de lactato de calcio en su superficie que los consumidores frecuentemente confunden con mohos (Phadungath et al. 2011).

2. Materiales y métodos

a. Preparación de las muestras

El caseinomacropéptido (CMP) fue provisto por AGROPUR (Le Sueur, Minnesota, USA), bajo la marca comercial BioPURE-GMP®. Su pureza según el proveedor fue (en base seca): 86,3 % (p/p) (N x 7,07). El contenido de calcio mineral del polvo de CMP fue determinado con un espectrofotómetro de absorción atómica (AAnalyst 200 PerkinElmer, Shelton, CT, USA) y fue 0,68% (p/p). El L-lactato de calcio pentahidratado [$Ca(C_3H_5O_3)_2 \cdot 5H_2O$], $CaLac_2$, usado en este trabajo fue marca Sigma-Aldrich (Argentina) con una pureza del 98,1% y una solubilidad de 50 g/l.

Se prepararon soluciones acuosas sobresaturadas combinando 8 g de lactato de calcio pentahidratado con cantidades variables de CMP (0, 0,3 y 0,5 g) en 100 ml de agua ultrapura (1,8 ± 0,1 µS/cm). El Ca^{2+} iónico incorporado por el CMP a la solución fue 0,002 y 0,003 g, cantidades que representan menos del 0,04 %. El pH estuvo entre 6,88 y 7,02. Las soluciones se mantuvieron bajo agitación a temperatura constante de 5, 10 y 20 ºC. Luego de dos horas, fueron centrifugadas y filtradas con filtros jeringa de ®Nylon 0,45 y 0,22 mm antes de cada análisis. El calcio total se determinó por titulación con EDTA (0,05 M).

b. Titulación con EDTA

La técnica utilizada fue una adaptación de Vavrusova et al. (2014). Se titularon 1 ml de muestra con lactato de calcio, 40 ml de agua ultrapura y 2 ml de solución de NaOH 2 N con EDTA (0,05 M). Como indicador se utilizó una punta de espátula de NET (Negro de eriocromo T, Biopack). Las muestras se valoraron hasta que el color rosa inicial cambió a violeta oscuro, lo que indicó el punto final. Se construyeron curvas de calibración con solución patrón de $CaCl_2$ 0,1 M (Hanna Instruments, HI 4004-01).

c. Determinación de la actividad de calcio

La actividad del ion calcio fue determinada con un electrodo selectivo (Hanna Instruments, USA) que mide los iones libres en solución. La calibración del

electrodo se realizó usando soluciones acuosas 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} y 10^{-2} M, preparadas con una solución patrón de $CaCl_2$ 0,1 M (Hanna Instruments, HI 4004-01). Este procedimiento se realizó cada vez que se utilizó el electrodo. Por otro lado, la conductividad se determinó con un conductímetro Edge® (Hanna Instruments, modelo HI2003-02, Rumania). Los ensayos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente. La calibración del equipo se realizó con soluciones patrones: 1413 µS/cm (Hanna Instruments, HI 70031); 5000 µS/cm (Hanna Instruments, HI 70039) y 12.880 µS/cm (Hanna Instruments, HI 70030).

Griffin et al. (1973) propusieron una relación lineal entre la conductividad (λ) y la fuerza iónica (I):

$$I \cong 0{,}013\ \lambda \quad (1)$$

donde, I es la fuerza iónica (mol L^{-1}) y λ la conductividad medida (mS cm^{-1}). Los valores obtenidos de I a partir de la conductividad experimental fueron usados para calcular los coeficientes de actividad según la ecuación de Davies:

$$log\gamma^{z\pm} = -A_{DH}\, Z^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0{,}30\ I\right) \quad (2)$$

donde, γ es el coeficiente de actividad; Z=+2 para los iones Ca^{2+} y A_{DH} es la constante de Debye–Hückel. Los valores de la constante son función de la temperatura siendo 0,491; 0,498 y 0,506 para 0, 10 y 20 ºC respectivamente (Davies et al. 1962).

La actividad de calcio ($a_{Ca^{2+}}$) se calculó a partir de la ecuación de Nerst que relaciona el potencial del electrodo (mV) con pCa:

$$\text{pCa } (= -\log a_{Ca^{2+}}) \quad (3)$$

Una vez calculada la concentración de cada una de las especies, la fuerza iónica se recalculó con el fin de obtener el valor verdadero. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$I = \frac{1}{2}\sum ci\ zi^2 \quad (4)$$

donde, ci es la concentración de cada ion y zi es la valencia del ion.

Con el nuevo valor de la fuerza iónica se obtuvieron las nuevas constantes termodinámicas y los coeficientes de actividad. Estas iteraciones fueron repetidas hasta un valor constante de fuerza iónica.

d. Cálculo de la concentración molar de las especies

Para el lactato de calcio pentahidratado, los equilibrios son los siguientes (Liu et al. 2021):

$$CaL_2 \cdot 5H_2O \leftrightarrow CaL^+ + L^- + 5\,H_2O \quad (5)$$

$$CaL^+ \leftrightarrow Ca^{+2} + L^- \quad (6)$$

Las concentraciones se obtuvieron según las siguientes relaciones:

$$[CaL^+] = [Ca^{+2}]_{Total} - [Ca^{+2}]_{Libre} \quad (7)$$

$$[L^-] = [Ca^{+2}]_{Total} + [Ca^{+2}]_{Libre} \quad (8)$$

La nueva fuerza iónica se verificó con la siguiente ecuación:

$$I = \frac{1}{2}(4[Ca^{2+}] + [CaL^+] + [L^-]) \quad (9)$$

2.5. Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prims v8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico. Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias fueron determinadas por la prueba de Tukey para $P < 0{,}05$.

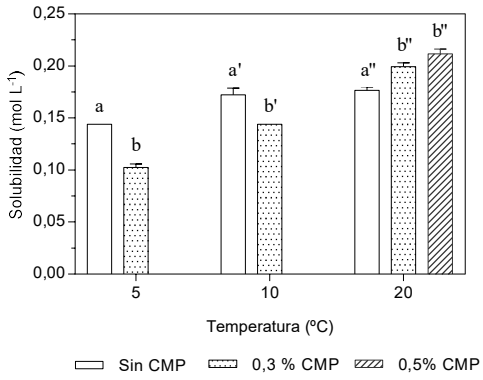


Figura 1. Solubilidad del lactato de calcio en función de la temperatura (5, 10 y 20 ºC) en ausencia de CMP y presencia de 0,3 % y 0,5 % de CMP. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0{,}05$).

3. Resultados y Discusión

La solubilidad del lactato de calcio en agua ultrapura y en presencia de CMP se analizó bajo diferentes condiciones de temperatura (5, 10 y 20 ºC) a pH 7 y se determinó mediante la titulación con EDTA. La **Figura 1** muestra que la solubilidad del lactato de calcio pentahidratado en agua ultrapura aumentó ligeramente con la temperatura siendo 3,16 ± 0,01 mol L^{-1} (5 ºC); 3,78 ± 0,15 mol L^{-1} (10 ºC) y 3,88 ± 0,08 mol L^{-1} (20 ºC) como anteriormente fue reportado por Vavrusova et al. (2014). El proceso de disolución es, en consecuencia, endotérmico con ΔH disolución > 0, como ocurre con la mayoría de las sales de calcio relacionadas con los alimentos en agua (Vavrusova et al. 2014). Se observa claramente en la misma figura que, en presencia de 0,3% de CMP disminuyó la solubilidad en un 30 % a las temperaturas de 5 y 10 ºC. Asimismo, la presencia de 0,3 y 0,5 % de CMP la aumentó entre un 20 y 24% a 20 ºC En otras palabras, más cantidad de CMP se incorporó a la disolución mayor fue el aumento de la solubilidad, a 20 °C. En la **Figura 2**, se observa el cambio de coloración la disolución del Lac_2Ca en presencia del péptido.

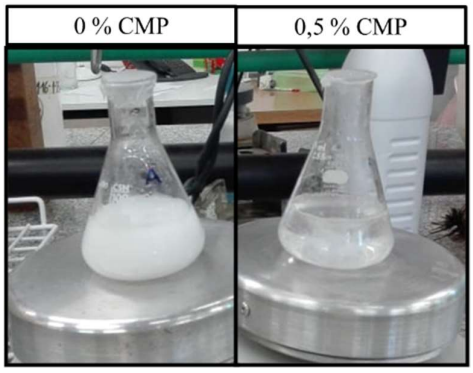


Figura 2. Ensayo de solubilidad de L-lactato de calcio pentahidratado en ausencia (Izq.) y presencia (Der.) de 0,5% de CMP.

La actividad de los iones calcio de la solución sobresaturada del lactato de calcio en agua fue determinada electroquímicamente con un electrodo de ion selectivo de calcio, en el mismo rango de temperaturas entre 5 a 20 ºC. Tal como puede observarse en la **Figura 3 A**, la temperatura afectó ligeramente la actividad del calcio, siendo menor a 20 ºC (aproximadamente 0,03). Vavrusova et al. (2014) hallaron una tendencia similar para soluciones sobresaturadas de L-lactato, D-gluconato y D-lactobionato de calcio, en la cual la actividad de los iones calcio también disminuyó con el incremento de la temperatura.

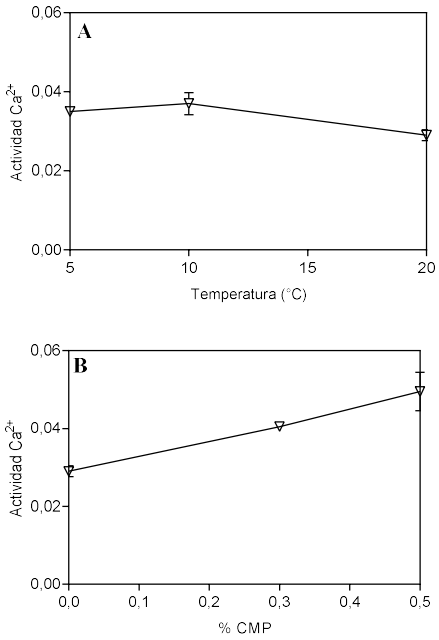


Figura 3. Actividad de calcio en función de: **A**) la temperatura y **B**) presencia de CMP a 20 ºC. Las barras representan el desvío estándar.

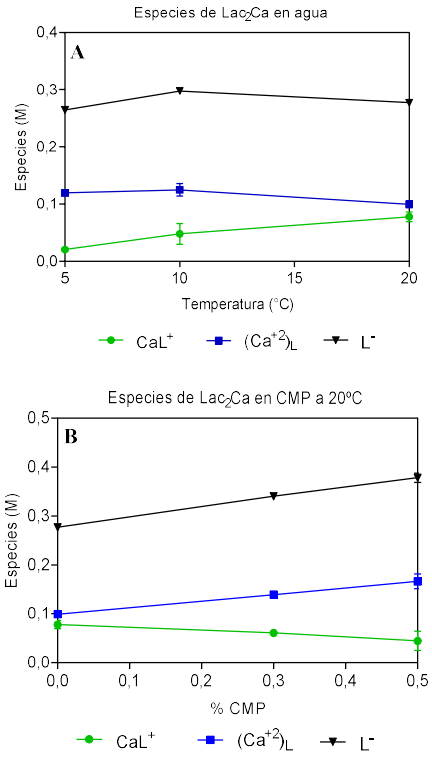


Figura 4. Concentración molar de cada una de las especies [L^-], [Ca^{2+}], [CaL^+] del equilibrio de la Ecuación 6 en función de: **A**) la temperatura y **B**) presencia de CMP a 20 ºC. Las barras representan el desvío estándar.

Para entender el efecto de la disminución de actividad de calcio con la temperatura, se debe analizar las especies presentes en el equilibrio. La primera de las ecuaciones de equilibrio (**Ecuación 5**) está completamente desplazada a la derecha, mientras que la segunda (**Ecuación 6**) es un equilibrio. En agua ultrapura (**Figura 4 A**) se observó que al aumentar la temperatura a 20 ºC se incrementó la concentración de [CaL^+], mientras que las concentraciones de [Ca^{2+}] y [L^-] se mantuvieron prácticamente constantes. La Kass = $[CaL^+]/aCa^{+2}[L^-]$ para la Ecuación 6 en agua aumentó con la temperatura, los valores obtenidos fueron 2,2±0,5, 5,9 ± 0,5 y 9,8 ± 1,5 para 5, 10 y 20 °C. El valor obtenido de Kass a 20 °C fue la cuarta parte del reportado por Vavrusova et al. (2014). Además en comparación con otras sales de calcio (D-lactobionato y D-gluconato) el anión L-lactato es el que tiene la más baja constante de asociación con el ión calcio (Vavrusova et al. 2014). Al graficar el ln Kass en función de la inversa de la temperatura absoluta según la ecuación de van´t Hoff

$$lnKass = -\frac{\Delta Hass}{RT} + \frac{\Delta Sass}{R} \quad (7)$$

se determinó un valor para el ΔHass de 66 ± 7 kJ/mol y ΔSass de 0,24 ± 0,02 kJ/mol (R^2=0,9887). La linealidad confirma la dependencia con la temperatura, siendo la asociación (ecuación 6) un proceso espontáneo (ΔGass =-4,3 kJ/mol) a 20 °C. Vale la aclaración que la disolución de la sal involucra ambas reacciones (ecuaciones 5 y 6), pero los parámetros termodinámicos involucran a la ecuación 6.

A 20 ºC, se observó un aumento de la actividad de calcio al incorporar 0,3 y 0,5% de CMP (**Figura 3 B**). En la **Figura 4** se muestran las diferentes especies que forman parte de los equilibrios, según las Ecuaciones 5 y 6. La **Figura 4 B** muestra que a 20 ºC y en presencia de CMP, disminuyó la concentración de [CaL^+], y aumentó la concentración de [Ca^{2+}] y [L^-]. La Kass = $[CaL^+]/aCa^{+2}[L^-]$ disminuyó desde 9,8 (sin CMP) a 4,4±0,5 y 2,2 ± 0,5 en presencia de 0,3% y 0,5% de CMP, respectivamente. Los resultados mostraron que la presencia de CMP redujo la Kass de la ecuación 6, principalmente al disminuir la concentración de [CaL^+]. Estos resultados evidenciaron que el CMP tiene alta afinidad por el [CaL^+], motivo por el cual aumenta la solubilidad del Lac_2Ca.

Añadir pequeñas cantidades de CMP en la elaboración de quesos Cheddar podría inhibir la formación de cristales de Lac_2Ca solamente a 20 ºC, pero no a temperaturas de refrigeración. Por otro lado, la sobresaturación del Lac_2Ca en presencia de CMP indica que a 20 °C la combinación de ambos podría incrementar la bioaccesibilidad de calcio de los suplementos dietarios.

4. Conclusiones

La presencia de CMP disminuyó la solubilidad del L-lactato de calcio a 5 y 10 ºC. Desde un punto de vista tecnológico este resultado es desfavorable, ya que, al bajar la temperatura, la solución sobresaturada de Lac_2Ca precipitaría. Por otro lado, a 20 ºC, el CMP aumentó la solubilidad principalmente interactuando con el [CaL^+]. La sobresaturación de Lac_2Ca en presencia de CMP podría ayudar a optimizar la bioaccesibilidad de suplementos dietarios.

5. Referencias

Burgos, V. E., M. J. Binaghi, P. A. R. de Ferrer and M. Armada (2018). "Effect of precooking on antinutritional factors and mineral bioaccessibility in kiwicha grains." *Journal of Cereal Science* **80**: 9-15.

Davies, C. W. and T. Shedlovsky (1962). "Ion Association." *Journal of The Electrochemical Society* **111**(3): 85C.

Eckert, E., F. Bamdad and L. Chen (2014). "Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein." *Food Chemistry* **159**(0): 498-506.

Garcia, A. C., M. Vavrusova and L. H. Skibsted (2018). "Supersaturation of calcium citrate as a mechanism behind enhanced availability of calcium phosphates by presence of citrate." *Food Research International* **107**: 195-205.

Gerhard, G. (2002). "El desafío de la fortificación." *Énfasis Alimentación* **4**: 62-65.

Griffin, B. A. and J. J. Jurinak (1973). "Estimation of activity coefficients from the electrical conductivity of natural aquatic systems and soil extracts." *Soil Science* **116**(1): 26-30.

Liu, X.-C., J. J. K. Kirkensgaard and L. H. Skibsted (2021). "Temperature effects on spontaneous supersaturation of calcium citrate in presence of lactate." *International Dairy Journal* **118**: 105023.

Loria, K. G. (2020). *Utilización del caseinomacropéptido como nueva estrategia de fortificación con calcio*. Doctor en Cs Aplicadas, Universidad Nacional de Luján, Argentina.

Phadungath, C. and L. E. Metzger (2011). "Effect of sodium gluconate on the solubility of calcium

lactate." *Journal of Dairy Science* **94**(10): 4843-4849.

Vavrusova, M., R. Liang and L. H. Skibsted (2014). "Thermodynamics of Dissolution of Calcium Hydroxycarboxylates in Water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(24): 5675-5681.

06TCA - Yogur incrementado en proteínas, reducido en lactosa y con agregado de una bacteria potencialmente probiótica. Efecto de la formulación en propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y reológicas.

Yogurt increased in protein, reduced in lactose and with the addition of a potential probiotic bacteria. Effect of the formulation on physicochemical, microbiological and rheological properties.

Vénica, Claudia Inés[1,2]; Spotti, María Julia[2,3]; Vélez, María Ayelén[1,2]; Rebechi, Silvina R.[1,2]; Senovieski, Matías Luis[2]; George, Guillermo Andrés[1,2]; Caballero, María Soledad[1,2]; Vinderola, Gabriel[1,2], Perotti, María Cristina[1,2]

[1]Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Universidad Nacional del Litoral/Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNL/CONICET). [2]Facultad de Ingeniería Química (FIQ-UNL). [3]Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA-UNL). Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe, Argentina. clauvenica@fiq.unl.edu.ar

Resumen

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de diferentes ingredientes proteicos: polvos y retentado de leche, la incorporación de una β-galactosidasa y de una cepa de bifidobacteria potencialmente probiótica, en la cinética y perfiles de fermentación, en la distribución del tamaño de partículas, y en parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y reológicos del yogur durante la fermentación y almacenamiento (28 días/5 °C). El diámetro aparente de las micelas de caseínas y la distribución de tamaño, fueron diferentes entre las formulaciones. El tamaño aparente de las micelas aumentó desde Y1 a Y4. La evolución de pH fue similar en todas las fermentaciones hasta los 240 minutos; luego se observó una menor acidificación para Y1, lo que se manifestó en un retraso en alcanzar el pH final. Los recuentos de bifidobacterias y de estreptococos fueron similares y elevados (> 8,5 log UFC/g) durante el almacenamiento. La capacidad de retención de agua fue mayor en Y4 y menor en Y1, lo que se relacionó con el contenido de proteínas (Y4>Y1). Las mayores concentraciones de carbohidratos fueron para Y3 y Y4, lo que se relacionó con mayores contenidos de lactosa en las leches de partida. Todos los yogures exhibieron un comportamiento tixotrópico. El yogur Y4 mostró un comportamiento de flujo ligeramente diferente al de las otras muestras, exhibiendo un índice de comportamiento de flujo más bajo y una viscosidad Kokini más alta. Los yogures Y1 e Y3 fueron menos firmes que Y2 e Y4.

Palabras claves: Yogur probiótico y reducido en lactosa, Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas, Reología.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of the different protein ingredients: powder and milk retentate the incorporation of a β-galactosidase and a potential probiotic strain of bifidobacteria, on the kinetics and fermentation profiles, particle size distribution, physicochemical, microbiological and rheological parameters of yogurt during fermentation and storage (28 days/5 °C). The apparent diameter of the casein micelles and the size distribution were different among formulations. The apparent size of casein increased from Y1 to Y4. The evolution of pH was similar in all fermentations up to 240 minutes; then a lower acidification was observed for Y1, producing a delay of fermentation. Bifidobacteria and streptococcus counts were similar and elevated (> 8.5 log CFU/g) during storage. The water-holding capacitiy was highest for Y4 and lowest for Y1, which was related to the protein contents (Y4>Y1). The highest carbohydrate concentrations were for Y3 and Y4, which was attributed to the highest lactose concentration in these formulations. All yogurts exhibited thixotropic behavior. Yogurt Y4 showed a slightly different flow behavior than the other samples, exhibiting a lower flow behavior index and higher Kokini viscosity. Y1 and Y3 yogurts were less firm than Y2 and Y4 yogurts.

Keywords: Reduced lactose probiotic yogurt, Physicochemical and microbiological properties, Rheology.

1. Introducción

El mercado de leches fermentadas con características nutritivas, funcionales y sensoriales incrementadas es dinámico, y constantemente se lanzan al mercado nuevas propuestas. Entre las versionas más novedosas se identifican los yogures incrementados en proteínas (tales como el yogur "griego") y los reducidos en lactosa y en grasa, y con agregado de sustancias prebióticas y bacterias probióticas. Las proteínas son uno de los macronutrientes que contribuyen a otorgar saciedad; además, las proteínas lácteas aumentan los aminoácidos plasmáticos contribuyendo en la síntesis de proteínas musculares. Reducir la lactosa es ventajoso para contrarrestar los inconvenientes que presenta su digestión y absorción para las personas intolerantes. Por su parte, los carbohidratos con rol prebiótico (inulina, FOS, GOS) no deben hidrolizarse ni absorberse en el tracto gastrointestinal superior (esófago, estómago y duodeno) y deben ser fermentados selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y ser capaces de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud. Por otro lado, el yogur es una de las matrices más populares para vehiculizar probióticos.
Diferentes herramientas biotecnológicas se pueden emplear para lograr estos objetivos. En este trabajo nos proponemos: i) incrementar el contenido de proteínas de la formulación con ingredientes en polvo y concentrados líquidos obtenidos por membranas (retentado de ultrafiltración -UF-), ii) reducir el contenido de lactosa y favorecer la formación de GOS prebióticos (oligosacáridos de galactosa derivado de la lactosa) por vía enzimática con una β-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Damin *et al*., 2009; Martins *et al*., 2012); Vénica *et al*., 2016), y iii) incorporar una cepa potencialmente probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 (*B. lactis* INL1) que demostró propiedades antiinflamatorias y de prevenir infecciones entéricas en estudios *in vivo* (Burns *et al*., 2017). Dado que todas estas intervenciones pueden afectar el proceso fermentativo, viabilidad microbiana, y calidad (textura, microestructura, flavor) del producto final, es que requieren ser optimizadas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar el efecto de las estrategias en la cinética y perfiles de fermentación (carbohidratos y ácidos orgánicos), en la distribución de tamaño de partículas, y en parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y reológicos del yogur durante la fermentación y almacenamiento (28 días a 5 °C).

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

La leche concentrada por ultrafiltración a dos niveles (MC1 y MC2, 8% y 6% p/v proteínas, respectivamente), fue obtenida en el equipo de membrana escala piloto (Hidrobiot S.R.L., Santo Tomé, Santa Fe, Argentina) utilizando una membrana polimérica de 10 kDa (HFK-131 Food & Dairy UF-Elements, Koch Membrane Systems, Estados Unidos), partiendo de leche descremada. Se trabajó a 20 ± 5 °C y 0,7 psi de presión transmembrana. La leche descremada (SM, < 0,1% p/v grasa) y la crema (60% p/v grasa), se obtuvieron con una descremadora centrífuga (Alfa Laval, Suecia) procesando leche bovina cruda provista por Milkaut S.A. (Frank, Santa Fe, Argentina). Leche en polvo descremada (SMP) y concentrados de proteínas de suero al 35 y 80% (WPC35 y WPC80, respectivamente), fueron provistos por Milkaut S. A. La pectina fue suministrada por Saporiti S. A. (Buenos Aires, Argentina). La enzima β-galactosidasa (YNL-2 GODO-Shusei Company Limited, Tokyo, Japón) y el fermento clásico de yogur compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* (YF-L811, Hansen Chr., Buenos Aires, Argentina), fueron provistos por los respectivos proveedores. La cepa *B. lactis* INL1 fue aislada de leche materna en la ciudad de Santa Fe (Argentina) y pertenece a la colección de cultivos autóctonos del INLAIN; la misma se incorporó como cultivo liofilizado (Vinderola *et al.*, 2012; Zacarías *et al.*, 2011).

2.2. Experiencias preliminares

En experiencias preliminares de elaboración de yogur empleando el protocolo indicado en 2.3., se ensayó la incorporación de la bifidobacteria en dos etapas del proceso: junto con el fermento y al finalizar el proceso de fermentación, a las formulaciones Y2 y Y3. Se realizaron recuentos de *S. thermophilus* y *B. lactis* INL1 en las leches recién inoculadas y en el yogur (1, 14 y 28 días). Además, se analizó el pH durante la elaboración.

2.3. Elaboración de los yogures

Se prepararon diferentes formulaciones con los ingredientes mencionados para conseguir yogures con 6 - 8% p/v de proteínas; en todos los casos se adicionó crema para conseguir aproximadamente 1,5% p/v de grasa. Se adicionó pectina a todas las formulaciones (0,15% p/v). Se elaboraron 4 tipos de yogures: Y1 (MC1), Y2 (MC2+WPC80), Y3 (MC2+WPC35) y Y4 (SM+WPC80+SMP), a escala laboratorio (500 mL). Se utilizó un protocolo estandarizado para yogur tipo batido (Vénica *et al.*, 2019), con modificaciones, y

además, teniéndose en cuenta los resultados de las experiencias preliminares. El mismo consistió de las siguientes etapas: hidratación de los ingredientes en condiciones de refrigeración, tratamiento térmico (80 °C/10 min.), enfriamiento a la temperatura de fermentación, inoculación con el fermento y adición de la enzima (0,2 g/L), incubación a 42 °C en baño termostatizado hasta alcanzar el pH final (4,75 ± 0,05), enfriamiento a 20 – 25 °C, adición de la cepa de bifidobacteria para alcanzar una concentración de bacterias de 10^7 UFC/mL, y almacenamiento a 5 °C por 28 días. Se midió el pH de las leches y la distribución de tamaños de partículas (antes y después del tratamiento térmico). Se monitoreó la acidez durante la fermentación y almacenamiento (1, 14 y 28 días). Se cuantificaron las concentraciones de carbohidratos y de ácidos orgánicos de las leches y de los yogures (14 días). Los recuentos microbianos y la capacidad de retención de agua (CRA) se analizaron durante el almacenamiento (1, 14 y 28 días). Se determinaron la composición global y reología de los yogures (14 días). Se realizaron tres réplicas de elaboración.

2.4. Análisis fisicoquímicos y recuentos microbianos

Se midió el pH con un pHmetro digital (Orion 3 star benchtop, Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos) (Bradley *et al.*, 1992). La acidez titulable (AT) fue determinada por titulación con solución de NaOH N/9, expresándose los resultados en grados Dornic (1 ºD = 1 mg ácido láctico/10 mL leche) (International Dairy Federation, IDF 150:2012). Los contenidos de proteínas, sólidos totales y materia grasa se determinaron por métodos normalizados (IDF 020-1/2:2001, IDF 151:2005, IDF 1D:1996, respectivamente). Se analizaron los niveles de células viables de una de las cepas (*S. termophilus*) que componen el fermento con un método normalizado (FIL-IDF 117A:1988) y del cultivo de bifidobacterias utilizando un medio de cultivo selectivo MRS-LP (Vinderola y Reinheimer, 1999). La CRA del gel de yogur se determinó por pesada del suero liberado luego de la centrifugación de la muestra en condiciones estandarizadas (20 °C/5000 g/10 min) (Akalin *et al.*, 2012). Los análisis se realizaron por duplicado.

2.5. Distribución de tamaños

El diámetro aparente de las micelas de caseínas y la distribución de tamaño de partícula en las leches se determinó por dispersión dinámica de la luz (Zeta Sizer Nano ZS90, Malvern Panalytical Ltd., Reino Unido), a un ángulo de 90°. Los análisis se realizaron por triplicado. Las muestras se descremaron (4 °C/1000 g/10 min) y se diluyeron a una concentración adecuada de acuerdo con los parámetros de calidad del instrumento. Los índices de refracción para el agua y las leches utilizados fueron 1,332 y 1,476, respectivamente.

2.6. Análisis de carbohidratos y ácidos orgánicos por HPLC

Las concentraciones de carbohidratos (lactosa, glucosa, galactosa y GOS) y de ácidos orgánicos (cítrico, orótico, pirúvico, láctico y acético) se analizaron simultáneamente según Vénica *et al*. (2015), con un sistema HPLC de intercambio iónico (Perkin Elmer, Estados Unidos). Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) y un guarda columna Aminex Cation-H^+ (30 mm x 4,6 mm) (Aminex, Biorad Laboratories, Estados Unidos). La columna se termostatizó a 65 ºC y se usó H_2SO_4 0,01 M como fase móvil (0,6 mL/min). Los detectores de índice de refracción y de UV-visible permitieron detectar los carbohidratos y los ácidos orgánicos, respectivamente. La cuantificación de lactosa, glucosa y galactosa (g/100 g) y de los ácidos orgánicos se realizó mediante calibración externa utilizando los estándares correspondientes (Sigma Aldrich, Estados Unidos); para cuantificar los GOS se utilizó como estándar el trisacárido rafinosa (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

2.7. Reología

Se midió la viscosidad de los yogures en función de la velocidad de corte (0 a 200 1/s y viceversa) mediante una prueba tixotrópica (curvas de flujo ascendente y descendente), con un viscosímetro de cilindros concéntricos Rheolab QC (AntonPaar, Alemania), equipado con módulo C-LTD80/QC y un sistema de sensor CC27. Los ensayos se realizaron a temperatura controlada (10,0 ± 0,5 ºC). Las gráficas se obtuvieron utilizando Origin 8.0 (OriginLab Corp., Estados Unidos). Se utilizó el modelo de ley de potencia. La viscosidad aparente (ηapp) se tomó a 50, 100, 150 y 200 1/s, ya que estas son las velocidades de corte que se asemejan a lo que se ejerce contra el paladar.

El análisis del perfil de textura se realizó de acuerdo a lo descripto en Batista *et al.* (2021), realizando dos ciclos de punción a un nivel de deformación del 30% (con respect a la altura inicial de la muestra) utilizando una máquina Universal de ensayos (modelo 3344, INSTRON Corp., Norwood, USA). Las muestras estaban contenidas en recipientes de 60 mm de alto por 35 mm de diámetro, conteniendo una altura de 40 mm. Se utilizó una fuerza de contacto de 0,05 N,

a una velocidad de 1 mm/s y un tiempo de espera entre el primer y el segundo ciclo de 5 s. Se calcularon los siguientes parámetros: Dureza (N) (fuerza máxima en el primer ciclo de compresión), elasticidad (adimensional) (relación de la distancia entre el inicio hasta el máximo y la distancia del segundo ciclo de compresión y el inicio del hasta el máximo del primer ciclo de compresión), cohesividad (adimensional) (relación del área positiva del segundo ciclo de compresión sobre el área positiva del primer ciclo), gomosidad (N) (el producto de la dureza por la cohesividad), y la adhesividad (J) (el área negativa luego del primer ciclo de compresión). Las muestras no presentaron fractura (pico anterior al máximo en el primer ciclo de compresión), y por tratarse de muestras semisólidas no se calculó la masticabilidad. Los ensayos se realizaron por duplicado.

2.8. Análisis estadístico

Se calculó el promedio, la desviación estándar y se aplicó un análisis de variancia de una vía y test de Tukey para detectar diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%. Se empleó el software SPSS versión 10.0 (SPSS Inc., USA).

3. Resultados y Discusión

3.1. Distribución de tamaños de partícula

La distribución de tamaño de partícula de las leches antes del tratamiento térmico (AT) fueron similares (**Figura 1**) y se observó que el tratamiento térmico (DT) provocó un corrimiento de los picos, evidenciándose un incremento de tamaño. Además, antes del tratamiento térmico, la distribución de tamaños fue unimodal en todos los casos, mientras que después de aplicar el tratamiento térmico la distribución en Y3 e Y4 fue bimodal. Estos resultados indicarían que la incorporación de WPC35 y SMP+WPC80 provocarían la formación de agregados de partículas de mayor tamaño.

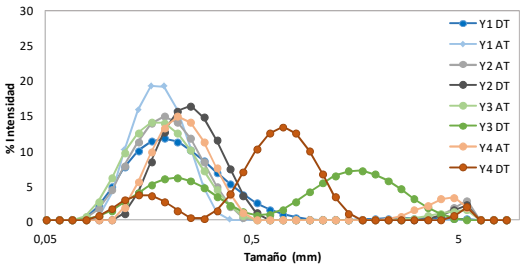


Figura 1. Distribución de tamaño de partícula de las leches preparadas para elaborar los yogures. Se muestran las curvas antes (AT) y después del tratamiento térmico (DT).

Respecto al diámetro aparente de las caseínas luego de aplicar el tratamiento térmico (**Tabla 1**), todas las formulaciones presentaron valores diferentes ($p < 0,05$, Y1 < Y2 < Y3 < Y4). Las diferencias encontradas en el presente trabajo podrían afectar la microestructura del yogur, lo cual ha sido reportado previamente (Saffon *et al*., 2013; Sandra y Dalgleish, 2005).

Durante la fermentación, la disminución de pH por la producción de ácido láctico por parte de las bacterias lácticas (BAL) del fermento ocasiona una disminución de la repulsión electrostática entre las principales proteínas de la leche, presentes como micelas de caseína autoasociadas, provocando la agregación de las mismas y formación de un gel homogéneo. El yogur tipo batido está compuesto por partículas de proteínas blandas con un diámetro medio < 20 µm, que se dispersan en el permeado de leche acidificada. La estructura final del producto está influenciada por el proceso de formación del gel durante la acidificación, tipo de fermento, composición de la formulación, temperatura y tiempo de fermentación, y por el esfuerzo mecánico aplicado durante el procesamiento, entre otros factores (Nobel *et al.*, 2016).

Tabla 1. Diámetro aparente de las micelas de caseínas en las leches luego del tratamiento térmico.

Leche	Diámetro aparente (caseínas) (nm)
Y1	$200,77 \pm 2,76^{a}$
Y2	$260,10 \pm 2,21^{b}$
Y3	$438,50 \pm 10,55^{c}$
Y4	$524,55 \pm 16,62^{d}$

Valores con superíndices diferentes difieren significativamente (test de Tukey, $p < 0,05$).

3.2. Selección del momento de agregado de la bifidobacteria

La evolución de pH durante la elaboración de los 4 yogures fue similar, finalizando el proceso de fermentación a las 5 h.

La concentración de bifidobacterias en las formulaciones Y2 y Y3 recién inoculadas fue mayor a 6 log UFC/g (6,5 log UFC/g y 6,9 log UFC/g, respectivamente). Durante el almacenamiento de los yogures, los niveles se mantuvieron entre 6,5 log UFC/g y 7,2 log UFC/g, independientemente del momento de agregado del cultivo probiótico. Según la Legislación Argentina (CAA Cap. XVII, Art. 1389, 2021), para que un alimento sea considerado probiótico deberá tener una carga de células viables entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante el período de validez del producto. La concentración

de *S. thermophilus* se mantuvo en niveles elevados hacia los 28 días (> 7,3 log UFC/g); el momento de agregado de la bifidobacteria no afectó la supervivencia del fermento de yogur para ambas formulaciones.
Debido a que el recuento de bifidobacterias no se modificó por el momento de su incorporación al proceso de fermentación, se decidió para las próximas experiencias su agregado al final del mismo. En efecto, se reporta que las bifidobacterias metabólicamente activas pueden producir ácido acético durante la elaboración o almacenamiento de yogur, lo que podrá impactar negativamente en el flavor del producto. Sin embargo, varios factores influencian este proceso (Akalin *et al*., 2004; Oliveira *et al*., 2012).

3.3. Evolución de pH durante la fermentación

La evolución de pH fue similar en todas las fermentaciones hasta los 240 minutos (**Figura 2**); a partir de allí se observó una menor velocidad de acidificación para Y1 en comparación al resto ($p<0,05$), lo que finalmente se manifestó en un retraso en alcanzar el pH final (4,7 ± 0,05). La disminución de pH es el resultado del consumo de lactosa y generación principalmente de ácido láctico, por la actividad acidificante del fermento. Asimismo, la cinética de disminución de pH depende también de la capacidad buffer de la matriz, que está influenciada por su composición (tipo y contenido de proteínas, estado de las mismas -nativas, desnaturalizadas- y constituyentes menores -fosfatos inorgánicos, citrato, ácidos orgánicos-). Los ingredientes en polvo poseen cierto grado de desnaturalización por el proceso aplicado durante su manufactura en contraposición al retentado de UF en el que las caseínas y proteínas de suero se encuentran en su estado nativo (Damin *et al*., 2009). Se ha reportado que formulaciones con elevado contenido proteico tienen mayor capacidad buffer, lo que se traduce en un mayor tiempo de fermentación (Jorgensen *et al.*, 2019).

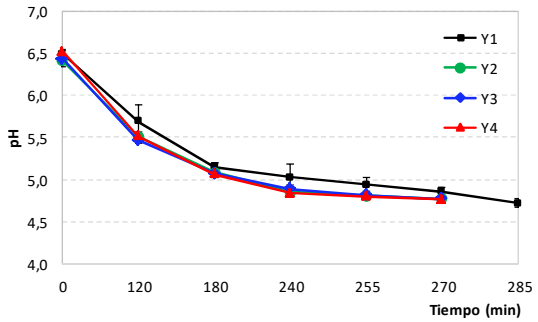


Figura 2. Evolución de pH durante la elaboración de los yogures a los 14 días (5 °C).

3.4. Composición fisicoquímica, recuentos microbianos y capacidad de retención de agua

Los valores de composición global de los yogures a los 14 días se observan en la (**Tabla 2**). La concentración de proteínas fue diferente ($p < 0,05$) entre las muestras, y varió entre 6,4 y 7,9 g/100 g; siendo menor en Y1 en comparación al resto de los yogures. Los contenidos de grasa fueron similares en todos los casos (1,2 - 1,4 g/100 g) y según lo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA, Capítulo VIII, 2020), están dentro de la categoría de parcialmente descremados (0,6 - 2,9 g/100 g). Los sólidos totales variaron ($p < 0,05$) de 13,5 a 16,7 g/100 g, siendo los valores de Y3 y Y4 superiores a Y1 y Y2.

Tabla 2. Composición global (g/100 g) de los yogures a los 14 días (5 °C).

Yogur	Sólidos totales	Proteínas	Grasas
Y1	$13,51 \pm 0,09^{b}$	$6,41 \pm 0,20^{b}$	$1,30 \pm 0,12^{a}$
Y2	$13,96 \pm 0,07^{b}$	$7,45 \pm 0,23^{a}$	$1,36 \pm 0,08^{a}$
Y3	$15,74 \pm 0,75^{a}$	$7,28 \pm 0,14^{a}$	$1,15 \pm 0,09^{a}$
Y4	$16,73 \pm 0,09^{a}$	$7,88 \pm 0,14^{a}$	$1,31 \pm 0,15^{a}$

Superíndices diferentes dentro de la columna difieren significativamente (test de Tukey, $p < 0,05$).

Se apreció una disminución de pH, y por lo tanto un comportamiento opuesto en la acidez titulable, durante el almacenamiento refrigerado de los yogures. Los cambios más notorios se produjeron en la primera mitad del periodo de almacenamiento y luego hacia los 28 días los valores permanecieron prácticamente sin cambios. La formulación de la leche no impactó ($p > 0,05$) en los valores de pH a cada tiempo de muestreo; los valores de postacidificación (pH día 28 – pH día 1) fueron similares a los reportados (0,22 - 0,30) (Vénica, 2014). Una pronunciada postacidificación no es deseable, ya que puede favorecer la sinéresis, producir defectos de textura y afectar las propiedades organolépticas del yogur (Chandan y O´Rell, 2006), impactando en la vida útil del yogur y por lo tanto en la aceptación del producto por los consumidores (Gürakan y Altay, 2010). No se encontraron diferencias ($p > 0,05$) en los valores de AT al inicio y final del almacenamiento, aunque diferencias fueron detectadas a la mitad de período ($p < 0,05$, Y3 > Y2 ~ Y4 > Y1). A los 28 días, el pH varió entre 4,44 y 4,51 y la AT entre 124 y 137 °D (1 °D = 100 mg ácido láctico/L). Estos valores de acidez están dentro de lo establecido por el CAA (2020) (60 – 150 °D). De acuerdo a Vénica (2014), el agregado de ingredientes proteicos (LPD y WPC) en la formulación de yogur no afectó el pH durante el almacenamiento, aunque algunas diferencias entre las formulaciones se detectaron

en la AT. Por otro lado, los mayores niveles de AT a los 28 días obtenidos en este trabajo comparativamente a los resultados de Vénica (2014) (62 - 99 °D), se atribuyen a incrementos en la capacidad buffer de la matriz por el tipo de ingredientes empleados y el mayor nivel.

Los recuentos de bifidobacterias y de estreptococos fueron elevados (> 8,5 log UFC/g, en ambos casos) a lo largo del almacenamiento por 28 días, y no se encontraron diferencias ($p > 0,05$) entre los yogures a cada tiempo de muestreo. El empleo de yogur como vehículo de bifidobacterias es un tema complejo, ya que la supervivencia de las mismas en este alimento fermentado suele ser muy variable, dependiendo de la cepa, de la composición de la matriz, del pH, del nivel de oxígeno disuelto, entre otros factores. En efecto, la viabilidad a menudo disminuye como consecuencia del bajo pH, el stress por la baja temperatura de almacenamiento, y la falta de nutrientes, por lo que resulta un desafío mantener niveles adecuados en los alimentos. La adición de prebióticos puede reducir estos factores de stress y aumentar la viabilidad de los probióticos (Rosburg *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, el nivel de *B. lactis* INL 1 se mantuvo constante lo que podría deberse a la presencia de GOS en la matriz que favoreció su supervivencia.

Lankaputhra *et al.* (1996) informaron que sólo 3 de 9 cepas de bifidobacterias ensayadas sobrevivieron en yogures (pH: 3,7 - 4,3). Klaver *et al.* (1993) encontraron que 14 de 17 cepas perdieron su viabilidad en leches fermentadas en la primera semana de almacenamiento. Debido a que la ingesta diaria sugerida es de aproximadamente 10^9 células viables, el producto debería tener al momento del consumo un nivel de 10^7 UFC/g de bifidobacterias viables para alcanzar dichos niveles con una porción aproximada de 100 g de yogur. Esto plantea un desafío para la industria del yogur en términos de asegurar la viabilidad celular hasta el final de la vida útil del producto (Akalin *et al.,* 2004).

La CRA es una medida indirecta de la sinéresis: a mayor capacidad de retención de agua, menor sinéresis. La sinéresis se define como la expulsión o separación de suero por contracción espontánea de la matriz proteica que se hace visible en la superficie del producto. Es considerado un defecto que afecta negativamente la calidad del producto y percepción del consumidor (Lee y Lucey, 2010). La presencia de sinéresis se relaciona con el grado de perturbación física a la que se somete el producto y también con un procesamiento inadecuado. Se encontraron diferencias ($p < 0,05$) entre los productos, a cada tiempo de muestreo; los menores valores se tuvieron para Y1 y los mayores para Y4. Este hecho está íntimamente relacionado con la composición de la matriz. En efecto, los niveles de proteínas y de sólidos totales fueron mayores para Y4 y menores para Y1. Similares resultados fueron obtenidos en Vénica (2014); la sinéresis disminuyó con el agregado de sólidos de leche de naturaleza proteica, lo cual no es sorprendente ya que, como se mencionó, es uno de los métodos más comunes empleados a nivel industrial para disminuir el defecto de sinéresis y contribuir además a la consistencia del producto (Chandan y O´Rell, 2006; Lee y Lucey, 2010)

3.5. Perfiles de carbohidratos y ácidos orgánicos

Los carbohidratos y ácidos orgánicos que se encuentran en los yogures son el resultado del metabolismo de las BAL; consumen la lactosa y generan ácido láctico principalmente. Además, sus concentraciones también están influenciadas por la composición de la formulación.

Los valores de carbohidratos y de ácidos orgánicos de los yogures a los 14 días se observan en las **Tablas 3** y **4**, respectivamente. En las leches, los contenidos de lactosa fueron: Y1, 4,68 ± 0,04; Y2, 4,35 ± 0,08; Y3, 6,88 ± 0,09 y Y4, 6,45 ± 0,09 g/100 g. Durante la elaboración, la disminución de lactosa es de aproximadamente 20-30% (Tamime y Robinson 2007). En este trabajo, la incorporación de β-galactosidasa ocasionó una disminución adicional debido a su actividad hidrolítica generando a su vez glucosa y galactosa. La lactosa en los yogures a los 14 días varió de 0,55 y 1,79 g/100 g ($p < 0,05$, Y3 > Y4 > Y2~Y1). La glucosa se encontró entre 1,24 y 1,93 g/100 g y la galactosa entre 1,76 y 2,24 g/100 g; para ambos monosacáridos, los menores valores ($p < 0,05$) se tuvieron en Y1 y Y2 y los mayores en Y3 y Y4. Asimismo, se verificó la actividad transgalactosidasa que posee la enzima ya que se detectaron GOS en todas las muestras; las concentraciones variaron desde 0,33 a 0,71 g/100 g ($p < 0,05$, Y3 ~ Y4 > Y1 ~ Y2). Esto se atribuyó a la mayor concentración de lactosa presente en las leches Y3 y Y4, sustrato para la síntesis de este compuesto bioactivo. Similares concentraciones de lactosa y GOS fueron reportados por Vénica *et al.* (2016) para diferentes variedades de yogures (4,15 – 4,65 % p/v proteínas y 1,30 – 1,50 % p/v grasa) reducidos en lactosa. Asimismo, los niveles más altos de GOS detectados en este trabajo fueron similares a aquellos reportados para formulas infantiles en las cuales los GOS son agregados como ingredientes (Chirdo *et al*. 2011).

Tabla 3. Concentración (g/100 g) de carbohidratos de los yogures a los 14 días (5 °C).

Yogur	Lactosa	Glucosa	Galactosa	GOS
Y1	$0,64 \pm 0,04^{c}$	$1,36 \pm 0,06^{b}$	$1,83 \pm 0,02^{b}$	$0,37 \pm 0,01^{b}$

Y2	0,55 ± 0,06^{c}	1,24 ± 0,07^{b}	1,76 ± 0,03^{b}	0,33 ± 0,01^{b}
Y3	1,79 ± 0,17^{a}	1,89 ± 0,05^{a}	2,24 ± 0,01^{a}	0,71 ± 0,01^{a}
Y4	1,30 ± 0,06^{b}	1,93 ± 0,05^{a}	2,29 ± 0,03^{a}	0,67 ± 0,02^{a}

Valores con superíndices diferentes dentro de la columna difieren significativamente (test de Tukey, $p < 0,05$).

Con respecto a los ácidos orgánicos, sólo se observaron diferencias ($p < 0,05$) en las concentraciones de cítrico y orótico entre los yogures, los demás ácidos no se modificaron. El láctico fue el ácido mayoritario (1385,21 – 1484,83 mg/100 g), seguido por el cítrico (218,86 – 319,67 mg/100 g) y el pirúvico (72,69 – 99,92 mg/100 g); bajos contenidos de acético (24,16 – 34,11 mg/100 g) y orótico (5,63 – 8,91 mg/100 g), fueron detectados.

Los valores de ácido láctico encontrados en nuestro trabajo son superiores a los reportados por Cruz *et al.* (2013) (288 mg/100 mL a los 21 días) para yogur probiótico (*S. thermophilus, L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, L. acidophilus* y *B. longum*), y fueron similares a aquellos reportados por La Torre *et al.* (2003) (937 - 1571 g/100 g) para leches fermentadas y yogures adicionados de bacterias probióticas (*L. acidophilus, B. bifidum, B. lactis, B. longun, B. infantis.* La Torre *et al.* (2003) también informaron similares valores de orótico (7,0-9,3) y menores niveles de pirúvico (4,4-12,7 g/100 g) y cítrico (63,7-82,3 g/100 g). La presencia de ácido acético en los yogures se asocia generalmente con la vía heterofermentativa de la lactosa producida por ejemplo por cepas de bifidobacterias. La Torre *et al.* (2003) reportaron valores de ácido acético desde 86 a 335 g/100 g en yogures probióticos. Sin embargo, en nuestro trabajo los contenidos de acético fueron bajos, lo que probablemente se debió a que la bacteria fue adicionada al final del proceso de elaboración.

Tabla 4. Concentración (mg/100 g) de ácidos orgánicos de los yogures a los 14 días (5 °C).

Yogur	Cítrico	Orótico	Pirúvico	Láctico	Acético
Y1	235,10 ± 1,50^{c}	5,85 ± 0,12^{c}	81,18 ± 23,74^{a}	1394,75 ± 37,52^{a}	24,16 ± 0,04^{a}
Y2	218,86 ± 0,45^{d}	5,63 ± 0,05^{c}	72,69 ± 6,88^{a}	1384,83 ± 56,26^{a}	34,11 ± 3,18^{a}
Y3	319,67 ± 0,45^{a}	7,54 ± 0,08^{b}	75,87 ± 6,00^{a}	1485,21 ± 31,01^{a}	30,17 ± 3,29^{a}
Y4	282,13 ± 3,96^{b}	8,91 ± 0,13^{a}	99,92 ± 10,51^{a}	1436,97 ± 97,77^{a}	28,94 ± 2,49^{a}

Valores con superíndices diferentes dentro de la columna difieren significativamente (test de Tukey, $p < 0,05$).

3.6. Reología

El comportamiento de flujo de las muestras ensayadas se puede observar en la Figura 3.

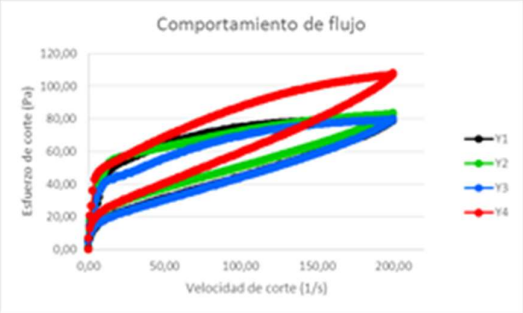


Figura 3. Esfuerzo de corte en función de la velocidad de corte de los yogures a los 14 días (5 °C).

Los yogures mostraron un comportamiento tixotrópico, es decir el esfuerzo de corte varió con la velocidad de corte y el tiempo de cizallamiento (acción mecánica), y la viscosidad disminuyó continuamente con el aumento en la velocidad de corte. Este comportamiento es típico del yogurt. Por lo general, los yogures exhiben una variedad de efectos no newtonianos, como pseudoplasticidad, tensión de cedencia, viscoelasticidad y dependencia del tiempo (Benezech y Maingonnat, 1994). Uno de los atributos más importantes para la calidad del yogurt es la textura. Los principales parámetros de procesamiento que influyen en la textura del yogur son la fortificación, concentración y tipo de ingredientes utilizados, tipo de estabilizadores y niveles de uso, contenido de grasa y condiciones de homogeneización, condiciones de tratamiento térmico, cultivo iniciador (tipo, tasa de desarrollo de ácido y producción de exopolisacaridos), temperatura de incubación (influye en el crecimiento de cultivos iniciadores, agregación de gel, fuerza de unión), pH, y manipulación del producto después de la fabricación (esfuerzos mecánicos y temperatura de mantenimiento) (Ozcan, 2013).

El modelo de ley de potencia se aplicó sobre la curva de aumento de velocidad de corte para obtener los parámetros mostrados en la **Tabla 5**. Como se puede observar, todos los yogures presentan valores de n menores a 1, por lo que tienen un comportamiento pseudoplástico. El yogur Y4 tiene el mayor valor de n, lo que indicaría que presenta menor decaimiento en la viscosidad a medida que aumenta la fuerza de corte en comparación con la muestra Y2. Tanto la muestra Y1 como Y3 tienen un comportamiento intermedio.

No hay diferencias ($p > 0,05$) en el índice de consistencia. El área de histéresis fue diferente entre las muestras; Y1 presenta la mayor área, mientras que Y2 tiene la menor, tanto Y3 como Y4 poseen valores intermedios. Esto estaría indicando que el yogur Y1 tiene una mayor consistencia, siendo más estructurado. En este yogur las interacciones son más fuertes o la

cantidad de agregados es mayor que para los demás.

Tabla 5. Parámetros de ley de potencia aplicados sobre la curva de esfuerzo vs velocidad de corte de 0-200 1/s de los yogures a los 14 días (5 °C).

Yogur	n	K (Pa.s)	Área (Pa.s)
Y1	0,25 ± 0,01^{ab}	26,8 ± 5,0^{a}	4718 ± 89^{a}
Y2	0,23 ± 0,01^{a}	29,7 ± 5,7^{a}	3676 ± 30^{c}
Y3	0,25 ± 0,01^{ab}	25,2 ± 4,6^{a}	4135 ± 110^{b}
Y4	0,29 ± 0,01^{b}	26,0 ± 2,8^{a}	4420 ± 133^{a,b}

Valores con superíndices diferentes dentro de la columna difieren significativamente (test de Tukey, $p < 0,05$).

Las viscosidades a 50, 100, 150 y 200 1/s se pueden observar en la **Tabla 6**. La viscosidad dinámica a 50 (1/s), normalmente llamada viscosidad de Kokini, es la más predictiva de las evaluaciones orales de viscosidad para alimentos líquidos y semisólidos, (Kokini *et al*., 1987). En este caso, este parámetro fue mayor en Y4 que en las demás muestras. A esta velocidad de corte, las viscosidades de Y1 y Y2 fueron iguales entre sí.
Se puede concluir que el yogur Y4 presentó un comportamiento reológico ligeramente diferente a los demás al exhibir mayor viscosidad de Kokini, menor comportamiento pseudoplástico, como lo indica el mayor valor de n y la menor variación entre las viscosidades a las diferentes velocidades de corte. Esto probablemente sea debido al mayor contenido de solidos con respecto al resto de las formulaciones, y al estado en que se encuentran las diferentes proteínas en los ingredientes empleados en la formulación.

Tabla 6. Viscosidad aparente (Pa.s) a diferentes velocidades de corte: 50, 100, 150 y 200 1/s de los yogures a los 14 días (5 °C).

Yogur	50 1/s	100 1/s	150 1/s	200 1/s
Y1	1,498 ± 0,010^{a}	0,856 ± 0,003^{a}	0,588 ± 0,001^{a}	0,441 ± 0,000^{a}
Y2	1,470 ± 0,015^{a}	0,853 ± 0,002^{a}	0,604 ± 0,001^{a}	0,466 ± 0,001^{b}
Y3	1,352 ± 0,014^{b}	0,826 ± 0,009^{a}	0,591 ± 0,005^{a}	0,455 ± 0,004^{b}
Y4	1,564 ± 0,023^{c}	1,005 ± 0,012^{b}	0,755 ± 0,007^{b}	0,598 ± 0,005^{c}

Valores con superíndices diferentes dentro de la columna difieren significativamente (test de Tukey, $p < 0,05$).

La textura es uno de los componentes más esenciales de la calidad del yogur. Para los productos alimenticios, según la Organización Internacional de Normalización, la textura representa todos los atributos reológicos y estructurales perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles y, también visuales y auditivos (Ozcan, 2013). La reología y la estructura de un producto evaluado por métodos instrumentales brindan información relevante sobre sus propiedades texturales.
Las curvas del análisis de perfil de textura se encuentran en la Figura 4, y los parámetros se pueden observar en la Tabla 7.

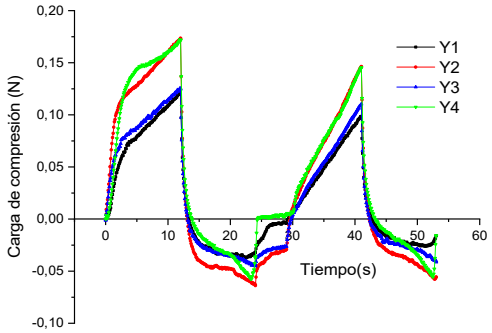


Figura 4. Carga de compresión en función del tiempo de los yogures a los 14 días (5 °C).

Tabla 7. Perfil de textura de los yogures a los 14 días (5 °C).

Yogur	Dureza (N)	Elasticidad*	Cohesividad*	Gomosidad* (N)	Adhesividad* (J)
Y1	0,123± 0,002^{a}	0.99446 ± 0.00001	0,60±0,03	0.075 ± 0.004	0,37±0,00
Y2	0,175± 0,002^{b}	1.00010 ± 0.00001	0,56±0,02	0.095 ± 0.004	0,56±0,14
Y3	0,126± 0,001^{a}	0.99715 ± 0.00003	0,63±0,01	0.079 ± 0.005	0,52±0,02
Y4	0,176± 0,004^{c}	0.99446 ± 0.00002	0,58±0,02	0.099 ± 0.004	0,45±0,12

Valores con superíndices diferentes dentro de la columna difieren significativamente (test de Tukey, $p < 0,05$). * No hay diferencias significativas.

Las curvas de las muestras Y1 e Y3 son muy similares entre sí, al igual que las muestras Y2 e Y4. Esto se ve reflejado también en los valores de la dureza, donde los yogures Y1 e Y3 mostraron ser menos firmes ($p < 0,05$) que Y2 e Y4. La dureza es el parámetro más importante para la evaluación de textura de yogur; es la fuerza necesaria para alcanzar una cierta deformación y se considera como una medida de firmeza del yogur (Mudgil *et al.* 2017).
Por otro lado, no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en los parámetros de elasticidad, cohesividad, gomosidad y adhesividad. La elasticidad es una medida que indica si la muestra luego de un esfuerzo aplicado puede retornar a su medida original. En este caso los yogures mostraron una buena elasticidad. La cohesión es una medida de la fuerza estructural de la muestra; la interconectividad de las partículas que conforman el sistema. Es una medida importante de la aceptabilidad del yogur por parte del consumidor. En cuanto a la gomosidad, se la considera como la energía requerida para

desintegrar un alimento semisólido hasta que puede ser tragado. Mientras que la adhesividad se considera la fuerza necesaria para eliminar el material adherido al paladar al comer. Se considera como una medida de la pegajosidad del yogur y por lo general esta inversamente relacionado con la calidad del mismo.

4. Conclusión

El desarrollo de yogures con características funcionales es una temática muy actual, lo que se demuestra por la constante irrupción de nuevos productos. En el presente trabajo obtuvimos resultados muy alentadores; se consiguieron formulaciones de yogur con alto nivel proteico, reducidos en tenor graso y en lactosa, y con la presencia de un compuesto reconocido como prebiótico, además de alta concentración de una bacteria potencialmente probiótica, cuyas características fisicoquímicas, microbiológicas y reológicas fueron muy adecuadas.

5. Referencias

Akalın, S.; Fenderya, S.; Akbulut, N. (2004). *Viability and Activity of Bifidobacteria in Yoghurt Containing Fructooligosaccharide During Refrigerated Storage.* International Journal of Food Science and Technology 39, 613–621.

Batista, L. F.; Marques, C. S.; dos Santos Pires, A. C.; Minim, L. A.; Soares, N. D. F. F.; Vidigal, M. C. T. R. (2021). *Artificial Neural Networks Modeling of Non-Fat Yogurt Texture Properties: Effect of Process Conditions and Food Composition.* Food and Bioproducts Processing 126, 164-174.

Benezech, T.; Maingonnat, J. F. (1994). *Characterization of the rheological properties of yoghurt—A review*. Journal of Food Engineering 4, 447-472.

Bradley, R.; Arnold, E.; Barbano, D.; Semerad, R.; Smith, D.; Vines, B. (1992). *Chemical and Physical Methods.* En: Marshall, R.T. (ed) Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association (APHA), Washington, USA

Burn, P.; Alard, J.; Hrdy J.; Boutillier, D.; Páez, R.; Reinheimer, J.; Vinderola, G.; Grangette, C.. (2017). *Spray-drying Process Preserves the Protective Capacity of a Breast Milk-derived* Bifidobacterium lactis *Strain on Acute and Chronic Colitis in Mice.* Scientific Report 24 (7)**,** 43211.

Chandan, R. C.; O´Rell, K. R. (2006). *Cap. 15: Yogurt plant: Quality assurance*. Manufacturing yogurt and fermented milks. Chandan, R. C. (Ed.), Blackwell Publishing, Estados Unidos.

Chirdo, F.G.; Menéndez, A.M.; Pita Martín De Portela, M.L.; Sosa, P.; Toca, M.D.C.; Trifone, L… *et al*., (2011). *Prebiotics in Infant Health*. Archivos Argentinos de Pediatria 109, 49–55.

Cruz, A. G.; Castro, W. F.; Faria, J.A.F.; Bolini, H. M. A.; Celeghini, R. M. S.; Raices, R. S. L… *et al.* (2013). *Stability of Probiotic Yogurt Added with Glucose Oxidase in Plastic Materials with Different Permeability Oxygen Rates During the Refrigerated Storage*. Food Research International 51, 723–728.

Damin, M. R.; Alcantara, M. R.; Nunes, A. P.; Oliverira, M. N. (2009). *Effects of Milk Supplementation with Skim Milk Powder, Whey Protein Concentrate and Sodium Caseinate on Acidification Kinetics, Rheological Properties and Structure of Nonfat Stirred Yogurt*. LWT – Food Science and Technology 42, 1744-1750.

Gürakan C. G.; Altay N. (2010). *Probiotic Dairy Beverages: Microbiology and Technology*. Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. Yildiz F. (ed.), CRC Press, Estados Unidos.

IDF (1988). International Dairy Federation. Yogurt. Enumeration of characteristic microorganisms. Colony count technique at 37 °C. IDF 117A:1988. Brussels, Belgium.

IDF 150:2012 (2012) Fermented milks-determination of titratable acidity-potentiometric method.

IDF 151:2005 (2005) Yogurt—determination of total solids contents (reference method).

IDF 20–1:2001 (2001) Milk-determination of nitrogen content. Part 1: Kjeldahl method.

Jørgensen, C. E.; Abrahamsen, R. K.; Rukke, E. O.; Hoffmann, T. K.; Johansen, A. G.; Skeie, S. B. (2019). *Processing of High-Protein Yoghurt – A Review*. International Dairy Journal 88, 42–59.

Klaver, F. M.; Kingma, F.; Weerkamp, A. H. (1993). *Growth and Survival of Bifidobacteria in Milk.* Nederlands melk en Zuiveltijdschrift 47, 151-164.

Kokini, J. (1987). *The Physical Basis of Liquid Food Texture and Texture-Taste Interactions*. Journal of Food Engineering 6(1), 51-81.

La Torre, L.; Tamime, A.Y.; Muir, D.D. (2003). *Rheology and Sensory Profiling of Set-type Fermented Milks Made with Different Commercial Probiotic and Yoghurt Starter Cultures*. International Journal Dairy Technology 56, 163-170.

Lankaputhra, W.; Shah, N.; Britz, M. (1996). *Survival of Bifidobacteria During Refrigerated Storage in the Presence of Acid and Hydrogen Peroxide*. Milchwissenschaft: Journal of Nutrition Research and Food Science 51, 65-70.

Lee, W. J.; Lucey J. (2010). *Formation and Physical Properties of Yogurt. Asian-Australasian.* Journal of Animal Sciences 23, 1127-113.

Martins, A. R.; Montero, R. L.; De Medeiros, F.; Burket, J.; Burket, C.A. (2012). *Simultaneous Enzymatic Hydrolysis and Lactic Fermentation to Obtain a Yogurt with Low Lactose Content.* Ciência e Agrotecnología 36, 551–559.

Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B. S. (2017). *Texture Profile Analysis of Yogurt as Influenced by Partially Hydrolyzed Guar Gum and Process Variables.* Journal of food science and technology 54(12), 3810-3817.

Nobel, S.; Ross, N.-L.; Protte, K.; Korzendorfer, A.; Hitzmann, B.; Hinrichs, J. (2016). *Microgel Particle Formation in Yogurt as Influenced by Sonication During Fermentation Microgel Particle Formation in Yogurt as Influenced by Sonication During Fermentation.* Journal of Food Engineering 180, 29-38.

Oliveira, R. P. S.; Perego, P.; de Oliveira, M. N.; Converti, A. (2012). *Growth, Organic Acids Profile and Sugar Metabolism of* Bifidobacterium lactis *in Co-culture with* Streptococcus thermophilus*: The Inulin Effect.* Food Research International, 48, 21–27.

Ozcan, T. (2013*). Determination of Yogurt Quality by Using Rheological and Textural Parameters*. En 2nd international conference on nutrition and food Sciences-ICNFS (pp. 27-28).

Rosburg, V.; Boylston, T.; White, P. (2010). *Viability of Bifidobacteria Strains in Yogurt with Added Oat Beta-Glucan and Corn Starch during Cold Storage*. Journal of Food Science 75 (5), C439-C444.

Safoon, M.; Richard, V.; Jiménez-Flores, R.; Gauthier, S.F.; Britten, M.; Pouliot, Y. (2013). *Behavior of Heat-Denatured Whey: Buttermilk Protein Aggregates During the Yogurt-Making Process and their Influence on Set-type Yogurt Properties*. Foods, 2(4): 444–459.

Sandra, S.; Dalgleish, D.G. (2005). *Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization and Heating on Structural Properties of Casein Micelles in Reconstituted Skim Milk Powde*r. International Dairy Journal 1095-1104.

Tamime, A.Y.; Robinson, R.K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt, Science and Technology*, 3rd edn. CRC Press, USA.

Vénica, C. I. (2014). *Aportes para el Logro de una Tecnología Tendiente a Disminuir el Contenido de Lactosa del Yogur y a Otorgarle Nuevas Características Funcionales*. Tesis de Doctorado en Tecnología Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Vénica, C.; Spotti, M.; Pavón, Y.; Molli, J.; Perotti, M. (2019). *Influence of Carrot Fibre Powder Addition on Rheological, Microstructure and Sensory Characteristics of Stirred-type Yogurt.* International Journal of Food Science and Technology doi.org/10.1111/ijfs.14415.

Vénica, C.; Wolf, I.; Bergamini, C.; Perotti, M.C. (2016). *Influence of Lactose Hydrolysis on Galacto-Oligosaccharides, Lactose, Volatile Profile and Physicochemical Parameters of Different Yogurt Varieties.* Journal of the Science of Food and Agriculture 96, 4929–4939.

Vinderola, C. G.; Reinheimer, J. A. (1999). *Culture media for the Enumeration of* Bifidobacterium bifidum *and* Lactobacillus acidophilus *in the Presence of Yoghurt Bacteria*. International Dairy Journal 9, 497-505.

Vinderola, G.; Zacarías, M.F.; Bockelmann, W.; Neve, H.; Reinheimer, J.; Heller, K. (2012). *Preservation of Functionality of* Bifidobacterium animalis *subsp* lactis *INL1 after Incorporation of Freeze-Dried Cells into Different Food Matrices*. Food Microbiology 30 (1), 274-280.

Wolf, I.; Vénica, C.; Perotti, M. (2015). *Effect of Reduction of Lactose in Yogurts by Addition of b-galactosidase Enzyme on Volatile Compound Profile and Quality Parameters*. International Journal of Food Science and Technology 50, 1076–1082.

Zacarías, M.F.; Binetti, A.; Laco, M.; Reinheimer, J.; Vinderola, G. (2011). *Preliminary Technological and Potential Probiotic Characterisation of Bifidobacteria Isolated from Breast Milk for use in Dairy Products*. International Dairy Journal 21, 548-555.

07TCA - Elaboración de premezcla para pan a partir de harina de bagazo (BSG) y levaduras agotadas (BSY) recuperadas de la elaboración de cerveza artesanal.

Preparation of bread premix from brewer´s spent grain (BSG) and brewer´s spent yeasts (BSY) recovered from the production of craft beer.

Macarena Ballusi[1]; Martina Espeche[1], Lucía Sabena[1], Agustina Silva[1], Luciana Rodríguez[1,2], Amira Siniscalchi[1,2], Mayra Chalapud Narváez[1,2] y Diana Constenla[1,2].

1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad nacional del Sur. Avda. Alem 1253, Bahía Blanca Argentina
2. Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) Universidad Nacional del Sur - CONICET. Camino Carrindanga km7, Bahía Blanca Argentina. Email: dconstenla@plapiqui.edu.ar

Resumen

El objetivo de este trabajo fue obtener una premezcla para elaborar panificados utilizando como materias primas harina del bagazo de malta agotado (BSG) y levaduras agotadas (BSY), residuos provenientes de la producción de cerveza artesanal. El BSG y BSY, provistos por una cervecería local, fueron acondicionados para su posterior utilización. En el caso de BSG se realizó un secado convencional (secadero de tambor rotativo 40 rpm, aire a 60°C y 3 m/s) hasta obtener un contenido de humedad inferior al 10%, se procedió a la molienda y tamizado (malla 900 μm) para obtener harina de BSG. Por otro lado, las levaduras, fueron reactivadas y cultivadas en soluciones crioprotectoras. Se evaluaron distintas soluciones y tiempos de cultivo para garantizar la viabilidad de las levaduras sometidas posteriormente a los procesos de congelado-liofilización (LSA: levadura seca activa). Una vez acondicionadas las materias primas, se obtuvo una formulación de la premezcla para elaboración de pan que consistió en 82,2% harina de trigo; 14,5% harina de BSG; 0,8% LSA; 2% azúcar y 0,5% sal. La LSA que resultó más efectiva fue la proveniente del cultivo en jugo de manzana 3°Bx; pH 5,5; 1,19 g/L $(NH_4)_2SO_4$ y tiempo de cultivo de 7 días a 30°C. Los panes elaborados con las muestras de levadura liofilizada tuvieron un levado más lento y menor que el elaborado con levadura comercial. Se evidenció en los panificados con levadura liofilizada un sabor amargo que se pudo eliminar introduciendo una etapa de lavado del BSY previo a su liofilización. Como conclusión se puede decir que los residuos provenientes de la elaboración de cerveza artesanal pueden reutilizarse para la elaboración de panificados. Es importante incluir una etapa de lavado del BSY. Por último, la calidad de los panificados obtenidos se puede mejorar incrementando la viabilidad de la LSA.

Palabras clave: PANIFICADOS, LEVADURA SECA ACTIVA, BAGAZO DE MALTA AGOTADO, LEVADURAS AGOTADAS.

Abstract

The aim of this work was to obtain a premix to make bread products, using raw materials as flour from brewer spent grain (BSG) and brewer spent yeast (BSY) residues from the production of craft beer. The BSG and BSY, supplied by a local brewery, were conditioning for later use. BSG was drying in a rotary drum dryer (40 rpm, air at 60 °C, and 3m/s) until obtaining a moisture content lower than 10%, then grinding and sieving (900 μm mesh), in order to obtain flour from BSG. On the other hand, the yeasts were reactivated and cultivated in cryoprotective solutions. At this point, different solutions, and culture times were tested to guarantee the viability of the yeasts, subsequently subjected to the freeze-drying process (LSA: active dry yeast). Once the raw materials were conditioned, a formulation of the premix for bread making was obtained, which consisted of 82.2% wheat flour, 14.5% BSG flour, 0.8% LSA, 2% sugar, 0.5% salt. The LSA cultivation in apple juice 3 °Bx, pH 5.5, 1.19g/L $(NH_4)_2SO_4$, culture time of 7days at 30°C, was the most effective. The breads made with the LSA samples had a slower and lower rise than that made with commercial yeast. A bitter taste in the baked goods was evidenced, that could be eliminated by introducing a washing stage of the BSY prior to freeze-drying stage. As a conclusion, it can be said that the residues from craft beer process, can be reused for the elaboration of bakeries, it is important to include a washing stage of the BSY to eliminate the compounds that confer bitter taste. Lastly, the quality of the baked goods obtained can be improved by increasing the viability of the LSA.

Keywords: BREAD PRODUCTS, ACTIVE DRY YEAST, BREWER SPENT GRAIN, BREWER SPENT YEAST.

1. Introducción

La cerveza es una bebida milenaria originaria de la cultura mediterránea clásica, vinculada desde la antigüedad a fines terapéuticos. Es elaborada con ingredientes naturales que han estado involucrados en su producción desde sus orígenes, como agua, cebada malteada, levadura y lúpulo. (Deloitte, 2017; Mussatto *et al.,* 2006). La malta es el ingrediente más importante de la elaboración que contribuye al color, aroma, sabor y cuerpo. Además, el uso de variedades de maltas proporciona diferentes cantidades y tipos de azúcares disponibles, lo que determina el contenido final de alcohol de la cerveza. Por otra parte, las proteínas de la malta juegan un papel fundamental en la estructura y formación de la espuma (Deloitte, 2017).

Un proceso de elaboración de cerveza tradicional, comienza con la utilización de grano almidonado, generalmente cebada, que se somete a etapas como el malteado, molienda y preparación del mosto (maceración, clarificación y hervido), con la adición de lúpulo. Posteriormente, el mosto se inocula con microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*), que son responsables de la formación de etanol, CO_2 y otros subproductos por su metabolismo fermentativo. A continuación, el mosto fermentado se somete a procedimientos como clarificación, maduración y envasado (Priest y Stewart, 2006). Sin embargo, luego del proceso de elaboración, la industria cervecera presenta grandes cantidades de subproductos y desechos derivados del proceso, como el grano gastado o bagazo (BSG), el lúpulo gastado y la levadura agotada (BSY). Estos residuos son responsables de la pérdida de aproximadamente 20 de cada 100 L de agua utilizada en el proceso de elaboración, especialmente por el alto contenido de humedad, entre el 80 y el 90%, proporcionando grandes pérdidas de mosto, extracto y también cerveza, dependiendo de la fase de la que se extrae el residuo, lo que da lugar a la generación de cantidades significativas de efluentes (Rocha dos Santos Mathias *et al.,* 2015).

El bagazo (BSG) es el subproducto cervecero más abundante, correspondiente alrededor del 85% del total de subproductos generados y representa, en promedio, el 31% del peso original de la malta (Salihu y Bala, 2011). La composición química de BSG varía según la variedad de cebada, la cosecha, las condiciones de malteado y maceración, la calidad y el tipo de adyuvantes agregados en el proceso de elaboración, entre otros factores (Huige, 2006). El bagazo es considerado un material lignocelulósico rico en proteínas, lignina, celulosa, hemicelulosa y lípidos. Las proteínas y fibras representan alrededor del 90% de su composición (Ikram *et al.,* 2017). Además, este residuo contiene aproximadamente un 80% de agua, lo que impide el almacenamiento a largo plazo debido al rápido deterioro microbiano. Aunque es el principal subproducto de la industria cervecera, ha recibido poca atención como producto comercializable y se utiliza principalmente como alimento para animales (Celus *et al.* 2007). Por otra parte, la levadura de cerveza agotada (BSY), también conocida como levadura residual o levadura excedente, es otro subproducto generado durante la elaboración de la cerveza, que representa hasta el 15% del total de subproductos generados. La BSY se recupera por sedimentación en la etapa final de la segunda fermentación y después de la maduración. Es una fuente abundante de proteínas, minerales y vitaminas del complejo B, además de ser una rica fuente de nutracéuticos como β-glucanos o mono y oligosacáridos (Ferreira *et al.,* 2010; Rachwall *et al.,* 2020; Puligundla *et al.,* 2020). Actualmente, parte de la levadura se recicla al proceso adicionando levadura fresca, y otra parte se usa, al igual que el bagazo, en dietas para animales después de la inactivación por calor (Huige, 2006; Ferreira *et al.,* 2010).

En este trabajo se presenta uno de los proyectos llevados a cabo como parte de la asignatura Laboratorio de Procesamiento de Alimentos del último año de la carrera de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Nacional del Sur. Bajo la hipótesis de que se puede obtener una premezcla para la elaboración de panificados de calidad diferencial, a partir de harina de trigo y reutilizando BSG y BSY provenientes de la elaboración de cerveza artesanal, se estudiaron los procesos de acondicionamiento de estos residuos para su posterior utilización, optimizando la conservación y la viabilidad de las levaduras. El objetivo del presente trabajo fue obtener harina de bagazo y la reutilización de la levadura como parte de una premezcla lista para usar en la elaboración de panificados, para darle valor agregado a los subproductos obtenidos de la industria cervecera.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención de harina a partir de bagazo cervecero

La materia prima utilizada fue bagazo tipo Porter provista por una cervecería local. A continuación, se describen las etapas para obtener la harina.

2.1.1 Secado

Se colocó 1 kg de bagazo húmedo (humedad inicial en base húmeda $W\% \approx$ 80-90) en secadero de tambor rotativo (40 rpm) con aire a 60°C y velocidad de 3 m/s, durante 7 h o hasta llegar a una humedad de inferior al 10% (CAA, 2021). El proceso se realizó por triplicado. Se pesaron las

muestras para medir humedad utilizando la siguiente ecuación:

$$W\% \left[\frac{m}{m}\right] = \frac{M_H - M_S}{M_H} 100 \quad (1)$$

Donde M_H es el peso húmedo y M_S es el peso seco en gramos.

2.1.2 Molienda y tamizado

La molienda fue realizada por triplicado para cada muestra en un molinillo Ariete y la harina tamizada con malla ASTM de 900 µm.

2.2 Análisis fisicoquímicos

Se realizaron análisis de contenido de humedad y cenizas a la harina obtenida. Los ensayos fueron por triplicado y los valores obtenidos promediados.

2.2.1 Contenido de humedad

Se colocaron 5 g de harina de bagazo en un recipiente de peso conocido, y se realizó la deshidratación en estufa de vacío a 60°C, 30 mmHg por 48 horas. Luego, las muestras fueron colocadas en un desecador con el fin de equilibrar la temperatura de la misma con la del ambiente, y se procedió a pesar. Se repitió el procedimiento hasta obtener un peso constante, y con la ecuación (1) se determinó el contenido de humedad *W%* [g de H_2O/100 g de muestra].

2.2.2 Cenizas

Se colocaron 2 g de harina de bagazo en un crisol de porcelana y se calcinó a fuego directo en un mechero, bajo campana, hasta que se dejaron de evidenciar humos blancos. La muestra se colocó en una mufla a 500°C durante 2 horas. Con la ecuación (2) se determinó el contenido de cenizas *C%* [g de cenizas/100 g de muestra].

$$C\% \left[\frac{m}{m}\right] = \frac{P_{cc} - P_c}{P_m} 100 \quad (2)$$

Donde P_{cc} es el peso del crisol con las cenizas, P_c es el peso del crisol y P_m es el peso inicial de la muestra (g). Finalmente se calculó el rendimiento del proceso de la obtención de harina de bagazo como la relación entre la cantidad del producto final y la cantidad de las materias primas utilizadas. Para obtener este valor, se realizaron balances de masa con los valores experimentales obtenidos.

2.3 Liofilización de levaduras

Para reactivar las levaduras agotadas provenientes del proceso de elaboración de cerveza estilo Porter, se utilizó como starter mosto diluido, es decir, una solución azucarada para alimentar las levaduras, (24h 30°C). Luego se inocularon en cuatro soluciones de cultivo diferentes, detalladas en la Tabla 1. Las diferentes soluciones se realizaron con el fin de conocer cuál era la más favorable para el crecimiento de las levaduras y a su vez generar una situación de estrés para que las levaduras produzcan trehalosa intracelular, que actúa como agente lioprotector (Bravo, 2020). La esterilización de materiales y soluciones se realizó en autoclave a 1,5 atm durante 20 min. Luego se adicionó la masa de levadura a cada solución (2g/100mL) y se homogeneizó (Martin *et al.*, 2017). Las soluciones se mantuvieron a una temperatura de 30 °C en una estufa de cultivo Faeta, durante 7 días, el tiempo de cultivo se determinó mediante estudios previos. Las soluciones incubadas, fueron enfriadas hasta alcanzar una temperatura de 4°C. Esto se realizó para facilitar la sedimentación de las levaduras. Se centrifugó en una centrífuga Rolco 2070, a 4580 rpm durante 15 minutos (Ávila Rincón *et al.,* 2015). Las muestras se recogieron en tubos descartando el sobrenadante. Las levaduras centrifugadas se lavaron con agua destilada para eliminar el contenido de compuestos amargos y se colectaron en cristalizadores, con una altura máxima de muestra de 1 cm, para facilitar la liofilización (muestras 1 a 4, Tabla 1). Se congelaron hasta -32°C en un freezer durante 48 horas. Finalmente, las levaduras congeladas fueron llevadas al equipo liofilizador L-A-B4-C Rificor por 4 días. Durante este proceso la temperatura del condensador se mantuvo en -50°C, y la presión en 0,01 mmHg (Martín *et al*., 2017). Finalizado el proceso, las levaduras liofilizadas se almacenaron en un frasco hermético para evitar que se humedecieran.

Tabla 1: Soluciones utilizadas para cultivar el BSY.

Muestra	Solución	Contenidos	ºBx
1	A	Mosto proveniente de la elaboración de cerveza	3,3
2	B	Jugo de manzana enriquecido con nitrógeno fácilmente asimilable $(NH_4)_2SO_4$ concentración 1,19 g/L, pH entre 5 y 6 corregido con NaOH	3,3
3	C	Agua con fructosa	4,6
4	D	Agua con sacarosa	4.6

2.3.1 Porcentaje de viabilidad en las LSA

Este procedimiento se realizó con las levaduras cultivadas en las soluciones antes del proceso de liofilización y luego del mismo. Y se utilizó levadura comercial Levex (se la nombró muestra 5) para hacer comparaciones. Previamente al conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), las muestras liofilizadas se hidrataron en una solución de fructosa 4,6°Bx. Para determinar

el porcentaje de viabilidad celular, se utilizó el método de diluciones seriadas (10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}) y siembra por extensión en cajas de Petri. El medio de cultivo fue YEPG agarizado (en g/L: extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20; agar, 15; pH 5,5). La incubación de las cajas de Petri sembradas se realizó en estufa de cultivo a 31°C, durante 48 horas (Martín *et al*., 2017). Se realizó un conteo de las UFC y se procedió a calcular su concentración por mililitro *N* (UFC/mL) mediante la siguiente ecuación:

$$N\left[\frac{UFC}{mL}\right] = \frac{N_{UFC}}{D.V} \quad (3)$$

Donde N_{UFC} es el número de UFC contadas por placa, D es el factor de dilución, y V es el volumen de la muestra sembrada (mL). Luego se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente ecuación:

$$Porcentaje\ de\ viabilidad = \left[\frac{x_f}{x_i}\right] 100 \quad (4)$$

Donde x_f es el número de UFC/mL contadas después de la liofilización, y x_i corresponde al número de UFC/mL antes de la liofilización. Este parámetro se utiliza como un indicador de la conservación de la viabilidad del cultivo en el proceso de liofilización.

Al igual que para la harina de bagazo, se calculó el rendimiento del cultivo y de la liofilización para obtención de la LSA, de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$Rendimiento\ cultivo = \left[\frac{m_{Lf}}{m_{Li}}\right] 100 \quad (5)$$

$$Rendimiento\ liofilización = \left[\frac{m_{LSA}}{m_{Lf}}\right] 100 \quad (6)$$

Donde m_{Li} es la masa de levadura inicial sembrada en el medio de cultivo (g), m_{Lf} es la biomasa obtenida al finalizar el cultivo (g) y m_{LSA} es la masa de levadura seca activa luego de la liofilización (g).

2.4. Elaboración de la premezcla

La premezcla para la elaboración de panificados se preparó con harina de bagazo, harina de trigo 000, levaduras liofilizadas, sal y azúcar. La proporción que se utilizó fue de 85:15 harina de trigo:harina de bagazo m/m %. Para determinar la composición de la premezcla se tuvo en cuenta una formulación para la elaboración de pan (Ktenioudaki *et al*., 2012). En la Tabla 2 se encuentra la formulación para 1 kg de premezcla final.

Tabla 2: Formulación de la premezcla.

Ingrediente	Cantidad (g)
Harina de trigo 000	822
Harina de bagazo	145
Levadura liofilizada	8
Sal	5
Azúcar	20

Con la formulación de la premezcla presentada en la Tabla 2, se elaboraron panes con cada una de las muestras de levaduras liofilizadas obtenidas previamente.

Se utilizó en todos los casos el mismo procedimiento, para ello, la premezcla fue colocada en forma de corona en un recipiente, en el centro se colocó el aceite de girasol (50g/kg premezcla) y de a poco el agua (670g/kg premezcla) fue incorporada hasta obtener una masa uniforme, la cual se dejó levar (cubierta por un film y a 30°C) por 1 h. Luego de este tiempo se amasó por 10 min y se llevó al horno eléctrico a una temperatura de 165 °C por 30 min.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el software estadístico de libre acceso INFOSTAT (Di Renzo *et al*., 2020).

3. Resultados y Discusión

3.1. Obtención harina de bagazo BSG

Después del proceso de secado del bagazo húmedo se estimó una remoción de agua del 81,7%. Este porcentaje de agua extraída, se encuentra en concordancia con lo reportado por otros autores (Vieira *et al.*, 2014).

En los procesos de molienda y tamizado se obtuvo un rendimiento del 95%. Y en el proceso global (secado, molienda y tamizado), el rendimiento de harina de bagazo obtenida a partir de bagazo húmedo fue 17,4%.

3.2. Análisis fisicoquímicos de harina de bagazo

En la Tabla 3 se presentan los contenidos de humedad y de cenizas de la harina de bagazo.

Tabla 3. Contenido de humedad y cenizas de la harina de bagazo BSG

Humedad (*W*%)	Cenizas (*C*%)
6,8481 ± 0,2097	7,8616 ± 2,8835

Los valores obtenidos muestran que la humedad de la harina de bagazo es menor al máximo permitido en el capítulo IX del CAA para Alimentos Farináceos – Cereales, Harinas y Derivados (CAA, 2021). Este valor permitió mantener la estabilidad de la harina y la calidad microbiológica.

El valor de cenizas obtenido resultó elevado comparado con los valores informados por otros autores, quienes trabajaron con diferentes bagazos

y obtuvieron valores entre 3,29 y 5,00% (Connolly *et al.,* 2013; del Río *et al.,* 2013; Vieira *et al*., 2014). Por otra parte, el capítulo IX del CAA (CAA, 2021) reporta valores inferiores al obtenido en este trabajo para salvado de avena. Este valor elevado puede deberse a que el bagazo, que se utiliza como materia prima, está constituido principalmente por fibra y minerales dado que hubo degradación y extracción de los carbohidratos en la etapa de obtención de mosto en el proceso de elaboración de cerveza (Öztürk *et al.*, 2002).

3.3. Liofilización de levaduras

En la Tabla 4 se presenta el rendimiento de los procesos de cultivo y liofilización para obtener LSA.

Los valores que se presentan en la Tabla son los obtenidos para biomasas de 7 días de cultivo. A partir de ese tiempo, se evidenció la disminución de actividad, precipitado de la biomasa y formación en algunos casos de una película sobre la superficie del cultivo. Las levaduras lograron aumentar la biomasa en todos los medios de cultivo.

Tabla 4. Rendimiento del cultivo y la liofilización

Muestra	Rendimiento cultivo, %	Rendimiento liofilización, %
1	633 ± 11 [a]	15,8 ± 0,3 [b]
2	655 ± 21 [a]	16.8 ± 1,6 [b]
3	648 ± 32 [a]	17,8 ± 0,2 [b]
4	608 ± 25 [a]	18,5 ± 1,3 [b]

Superíndices iguales en la misma columna indican que no existen diferencias significativas (p=0,32; p=0,19).

Los valores de rendimiento para el proceso de liofilización fueron los esperados, considerando que la biomasa poseía una humedad superior al 80%, resultando de gran importancia, la disminución del contenido de humedad, ya que el almacenamiento o manejo inadecuado de la levadura podría resultar en una contaminación de la misma con otros microorganismos que pueden afectar su posterior uso (Jacob *et al.,* 2019).

En cuanto al porcentaje de viabilidad, la solución que resultó más efectiva para lograr la supervivencia de las levaduras fue la solución B (a base de jugo de manzana), correspondiente a la muestra 2, para la cual, el recuento de UFC de la LSA fue del orden de magnitud del encontrado para la levadura comercial.

La Tabla 5 muestra el conteo de UFC/mL antes y después de la liofilización y el porcentaje de viabilidad para la muestra 2. Se puede observar que los conteos de UFC/mL antes y después de someter las levaduras al proceso de liofilización se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, por lo tanto, aunque el porcentaje de viabilidad es relativamente bajo, se puede considerar como un proceso efectivo, que se podría mejorar, optimizando las condiciones de cultivo.

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de levaduras liofilizadas en la muestra 2

Antes liofilización (UFC/mL)	Después liofilización (UFC/mL)	Porcentaje de viabilidad (%)
$1{,}7 \times 10^8$	4×10^7	23,53

3.4 Premezcla: Elaboración de panes

La premezcla obtenida, fue utilizada para la elaboración de panes. En la Figura 1 se muestran los panes elaborados con dos de las muestras de levaduras liofilizadas y con la levadura comercial. Los panes elaborados con las muestras de levadura liofilizada tuvieron un levado más lento y menor que el elaborado con levadura comercial. Además, en un mismo tiempo de levado el volumen de la masa con levadura liofilizada fue notablemente menor que el de la masa obtenida con levadura comercial.

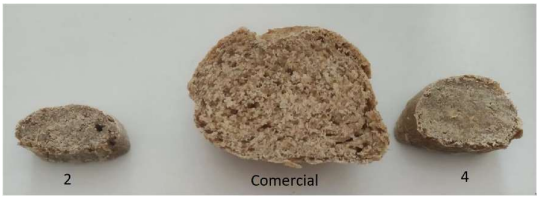


Figura 1. Panes elaborados con levadura comercial y muestras de levaduras liofilizadas 2 y 4.

Aunque el N_{UFC} para las levaduras liofilizadas de la muestra 2 y 4 fue del mismo orden de magnitud que el obtenido para la levadura comercial "Levex"
(6×10^7 UFC/mL), la diferencia en la efectividad del proceso de levado del pan puede deberse a la presencia de diferentes aditivos o mejoradores en la levadura comercial que aceleran el proceso de levado de los panificados. Los panes elaborados con LSA frente al pan que contenía levadura comercial denotaron un sabor ligeramente amargo, si bien no se realizó una evaluación sensorial planificada. Esto se corrigió con un lavado de las levaduras previo al proceso de liofilización.

4. Conclusiones

Se obtuvo harina a partir de bagazo (BSG) proveniente de la industria cervecera. La harina contuvo valores de humedad permitidos en el CAA y valores altos para cenizas debido a la alta presencia de fibra y minerales en BSG y a la degradación de carbohidratos en los procesos previos de elaboración de cerveza.

Respecto al uso de las levaduras agotadas (BSY) del proceso de elaboración de cerveza, se observó un buen crecimiento en todas las soluciones de cultivo, pero las que obtuvieron un mayor porcentaje de viabilidad (23,53%) fueron las levaduras cultivadas en la solución de jugo de manzana. Se estima que la viabilidad después del proceso de liofilización se puede aumentar controlando las condiciones del cultivo (tiempos, temperaturas, composición del medio) que favorezcan la producción metabólica de productos lioprotectores.

La premezcla fue obtenida estandarizando una formulación para la elaboración de panificados. Se formuló una premezcla para la elaboración de panificados y se observó que los panes elaborados con levadura comercial evidenciaron un levado significativamente mayor que los panes realizados con levadura liofilizada, bajo las mismas condiciones.

Si bien se logró el objetivo planteado que era obtener una premezcla para panificados, hay que continuar investigando distintos métodos de cultivo/secado para lograr aumentar la viabilidad de la LSA proveniente del BSY residuo de la elaboración de cerveza artesanal.

5. Referencias

Ávila Rincón, L; Naranjo Vasco, J.M.: Higuita Vásquez, J.C. (2015). *Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores.* Proyecto. Valencia: Universidad Católica de Manizales, Colombia.

Bravo, S.M.E. (2020). *Producción de biomasa de levaduras patagónicas seleccionadas para uso enológico.* Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.

Celus, I.; Brijs, K.; Delcourt, J.A. (2007). *Enzymatic hydrolysis of brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates*. Journal of agricultural and food chemistry, 55(21), 8703-8710.

Código Alimentario Argentino (CAA): Capítulo IX, Artículo 66/actualizado 2021.

Connolly, A.; Piggott, C. O.; FitzGerald, R. J. (2013). *Characterization of protein‐rich isolates and antioxidative phenolic extracts from pale and black brewers' spent grain*. International journal of food fcience & technology, 48(8), 1670-1681.

Deloitte. (2017). *La cerveza artesanal. Una experiencia multisensorial*. Recuperado de: https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/mx/Documents/consumerbusiness/2017/Cerveza-Artesanal-Mexico-2017.pdf

del Río Andrade, J. C. D.; Prinsen, P.; Gutiérrez Suárez, A. (2013). *Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals.* Journal of cereal science 58:248-254.

Di Rienzo J.A.; Casanoves F.; Balzarini M.G.: Gonzalez L.; Tablada M.: Robledo C.W. *InfoStat* versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Ferreira, I.; Pinho, O.; Viera, E.; Tavarela, J.G. (2010). *Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications*. Trends in food science & technology, 21(2), 77-84.

Huige, N.J. (2006). *Brewery by-products and effluents*, in: Hardwick, W.A. (Ed.), Handbook of brewing. Marcel Dekker, New York, pp. 501–550; 655-713.

Ikram, S.; Huang, L.Y.; Zhang, H; Wang, J.; Yin, M. (2017). *Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain*. Journal of food science, 82(10), 2232-2242.

Jacob, F. F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M., & Methner, F. J. (2019). *Yeast extract production using spent yeast from beer manufacture: influence of industrially applicable disruption methods on selected substance groups with biotechnological relevance*. European food research and technology, 245(6), 1169-1182.

Ktenioudaki, A.; Chaurin, V.; Reis, S.; Gallagher, E. (2012). *Brewer's Spent Grain as a Functional Ingredient for Breadsticks*. Journal of food science & technologý 47(8): 1765-1771.

Martín, M.C.; Muñoz, F.; Morata de Ambrosini, V.I. (2017). *Levaduras secas activas (LSA) autóctonas de la DOC San Rafael-Mendoza: Resistencia al proceso de liofilización*. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo, Conicet.

Mussatto, S.I.; Dragnone, G.; Roberto, I.C. (2006). *Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications*. Journal of cereal science, 43(1), 1-14.

Öztürk, S.; Özboy, Ö.: Cavidoğlu, İ; Köksel, H. (2002). *Effects of brewer's spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies*. Journal of the institute of brewing, 108 (1), 23-27.

Priest, F.G.; Stewart, G.G. (2006*). Handbook of Brewing,* 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL.

Puligundla, P.; Mok, C.; Park, S. (2020). *Advances in the valorization of spent brewer's yeast*. Innovative Food science & emerging technologies, 62, 102350.

Rachwałł, K.; Waśko, A.; Gustaw, K.; Polak-Berecka, M. (2020). *Utilization of brewery wastes in food industry*. PeerJ, 8, e9427.

Rocha dos Santos Mathias, T.; Alexandre, V.M.F; Cammarota, M.C.; de Mello, P.P.M.; Sérvullo, E.F.C. (2015). *Characterization and determination of brewer´s solid wastes composition* Journal of the institute of brewing, 121:400-404.

Salihu, A.; Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. African journal of biotechnology 10(3) 324-331.

Vieira, E., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Pinho, O., Saraiva, J. A., Ferreira, I. M., & Coimbra, M. A. (2014). *Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans.* Industrial crops and products, 52, 136-143.

08TCA - Harina de trigo enriquecida con harina de semillas de amaranto germinadas: calidad tecnológica de los panes.

Wheat flour enriched with germinated amaranth seeds flour: technological quality of breads.

Luciano M. Guardianelli[1], María V. Salinas[1], María C. Puppo[1, 2].

1. CIDCA - CIC -CONICET- Facultad de Ciencias Exactas- Universidad Nacional de La Plata. 47 y 116 (C.P 1900) La Plata, Argentina. luchoguardianelli@gmail.com
2. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-Universidad Nacional de La Plata. 60 y 119 (C.P. 1900). La Plata, Argentina.

Resumen

Se realizaron mezclas de harina de amaranto de semillas tanto germinadas (AG) como sin germinar (A) (0% -C, 5%, 15%, 25%) con harina de trigo para elaborar panes. Se obtuvieron los parámetros de fermentación de la masa (tiempo-tf, volumen máximo-V_{max}). Por su parte, se analizó el volumen específico (V_{esp}) de los panes, el color de la corteza, el alveolado, la textura y la relajación de la miga. Un alto contenido de harina de amaranto germinado disminuyó el V_{max} y aumentó el tf, obteniendo así panes con un bajo V_{esp} y una corteza oscura. También se obtuvo una miga firme y con mas masticabilidad, aunque con una estructura más aireada (una alta área ocupada por alvéolos). El pan AG25 presentó la miga más suave. El módulo elastico-E_1 de la miga aumentó y el tiempo de relajación-T_1 disminuyó al aumentar el contenido de harina de amaranto, sugiriendo la formación de una miga más estructurada; principalmente en el caso de la harina de amaranto sin germinar. La harina de trigo resistió la adición de hasta un 25% de harina de semillas de amaranto germinadas (AG25) sin cambios sustanciales en la calidad del pan.

Palabras clave: Panes de amaranto germinado-trigo, fermentación de masa, volumen de pan, textura de miga

Abstract

Amaranth flour mixtures were made from both germinated (AG) and non-germinated (A) seeds (0% -C, 5%, 15%, and 25%) with wheat flour to make breads. The dough fermentation parameters were obtained (time-tf, maximum volume-V_{max}). On the other hand, the specific volume (V_{esp}) of the loaves, the color of the crust, the alveolation, the texture and the relaxation of the crumb were analyzed. A high content of germinated amaranth flour decreased V_{max} and increased tf, thus obtaining loaves with a low V_{esp} and a dark crust. A firm and chewy crumb was also obtained, although with a more aerated structure (a high area occupied by alveoli). AG25 bread had the softest crumb. The elastic modulus-E_1 of the crumb increased and the relaxation time-T_1 decreased as the content of amaranth flour increased, suggesting the formation of a more structured crumb; mainly in the case of ungerminated amaranth flour. Wheat flour resisted the addition of up to 25% germinated amaranth seed flour (AG25) without substantial changes in bread quality.

Keywords: Keywords: Sprouted amaranth-wheat breads, dough leavening, bread volume, crumb texture

1. Introducción

Las semillas de amaranto (*Amaranthus)* resultan importantes desde el punto de vista nutricional, ya que poseen un alto nivel de proteínas ricas en lisina, fibra dietética y lípidos. El área de cultivo en nuestro país comprende las provincias de Jujuy, Santiago del Estero, Córdoba, el este de La Pampa y el oeste de Buenos Aires. De cualquier manera, el consumo del amaranto en nuestro país es bajo. Por su parte, la germinación se utiliza con el fin de mejorar las propiedades nutricionales de diferentes cereales y legumbres, en donde una descomposición de los principales componentes de reserva de las semillas, genera un aumento de azucares simples, aminoácidos libres y ácidos grasos insaturados (Cornejo *et al*., 2019; Guardianelli *et al*., 2019a). Dado que el pan de trigo es un alimento que se elabora a partir de harina de trigo refinada, es que los panificados son una buena fuente de energía pero de bajo valor nutricional, es por eso que muchos autores han utilizado diversos germinados en productos panificados para mejorar ese déficit nutricional. Pese a la utilización de diversos germinados para la elaboración de panes, poco se ha estudiado sobre las propiedades tecnológicas de los panes de trigo con la adición de harina de amaranto germinado. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de las harinas de semillas de amaranto germinadas y no germinadas en la calidad de los panes de trigo.

2. Materiales y métodos

Materiales

Se empleó harina de trigo (donada por Molino Campodónico Ltda., Argentina) cuya composición era: 11,2% de proteínas, 4,78% de fibra dietética total, 2,30% de lípidos, 0,60% de cenizas y 12,19% de humedad. Los parámetros farinográficos fueron: tiempo de desarrollo de 8 min, absorción de agua del 56,6%, grado de ablandamiento de 100 UB, estabilidad de 8,5 min.

La harina de semillas de amaranto no germinado presentó 57,3% de almidón, 0,1% de fructosa, 1,0% de glucosa, 1,8% de sacarosa, 12,8% de contenido de proteína, 9,3% de fibra dietética total, 6,3% de lípidos, 2,41% de ceniza y 11,1% de humedad. La harina de semillas de amaranto germinado durante 18 h a 30°C presentó 50,4% de almidón, 1,2% de fructosa, 4,7% de glucosa, 2,0% de sacarosa, 14,6% de proteína, 10,4% de fibra dietética total, 5,4% de lípidos, 2,76% de ceniza y 8,8% de humedad.

Metodología

Formulación de masa. Cada mezcla para masa consistía en harina de trigo (100 g), NaCl (base de harina de trigo al 1,5%), levadura fresca (3%), harina de amaranto y la cantidad óptima de agua. Los niveles de harinas de amaranto utilizadas fueron 5, 15 y 25% (base harina de trigo.). Las formulaciones fueron: harina de trigo (C) y con harina de amaranto: A (no germinado), AG (germinado).

Los sólidos se mezclaron en una amasadora a pequeña escala (KitchenAid Heavy Duty, EE. UU.) durante un minuto. Luego a los sólidos se les añadió agua con la levadura fresca previamente disuelta. La mezcla se amasó a 50 rpm (velocidad 1 por 1 min) y luego se mezcló a 90 rpm (velocidad 2) hasta alcanzar el tiempo de desarrollo. La cantidad óptima de agua (%) y el tiempo óptimo de mezcla (min) (parámetros farinográficos) utilizados para el desarrollo de la masa y determinados anteriormente (Guardianelli *et al*., 2019b) fueron respectivamente: C (55,9%, 11,7 min), 5% (56,0%, 9,0 min), 15% (56,0%, 6,5 min) y 25% (58,0%, 7,0 min). Todas las masas se hicieron por duplicado.

Optimización de la fermentación de la masa. Se introdujeron 50 g de masa en una probeta de 500 ml adaptado con un émbolo móvil y se colocó en una estufa de fermentación (Brito Hnos, Argentina) a 30°C durante 240 min. Se midió el volumen ocupado por la masa dentro del cilindro a lo largo del ensayo. Las mediciones se realizaron por triplicado. El aumento de volumen (ΔV), es la diferencia entre el volumen de la masa en un momento dado y el inicial, se registró en función del tiempo. Las curvas ΔV vs tiempo se modelaron usando el software Sigmaplot 10.0 usando la función sigmoidea (modelo de Chapman) (ecuación 1)

$$\Delta V = V_{max}\, 1 - \exp\left[-b\, t\right]^{c} \qquad (1)$$

Donde ΔV es el aumento de volumen, t es el tiempo y V_{max}, b y c son constantes. V_{max} es el volumen máximo alcanzado. El tiempo de fermentación (tf) es el tiempo necesario para alcanzar 3/4 de V_{max}.

Proceso de horneado. Se laminó la masa (90 g), se dejó reposar durante 15 minutos (cubierta con papel film) y se le dio forma con una formadora de pan (MPZ, Argentina). Las piezas se fermentaron a 30°C hasta alcanzar su tiempo óptimo de fermentación y se hornearon en un horno de convección LANIN II (PANIER, Argentina) (13 min a 200°C). La calidad del pan se evaluó 1,5 h después de la cocción.

Volumen específico de pan. El volumen se determinó según el método AACC (AACC, 2000) y se calculó el volumen específico (volumen / peso). La prueba se realizó por duplicado y se analizaron cuatro panes por cada formulación.

Color de la corteza. El color (valores L*, a* y b*) de la corteza del pan se midió con un colorímetro (Chroma Meter CR 400, Konica Minolta, Osaka, Japón). Las parametros L*, a* (+0, rojo; -, verde) y b* (+, amarillo; -, azul) se determinaron de acuerdo con el sistema espacial CIELab. Las mediciones (40) se realizaron sobre la corteza del pan. El índice de pardeamiento (IP) se calculó según Saricoban y Yilmaz (2010)

$$IP = 100 (X - 0,31) / 0,172 \quad (2)$$

Donde:

$$X = (a^*+1,75\ L^*) / (5,645\ L^* + a^* - 3,012\ b^*) \quad (3)$$

Contenido de humedad y actividad acuosa. El contenido de humedad de la miga de pan se determinó de acuerdo con el método AACC 44-19 (AACC, 2000). La actividad acuosa se midió en el medidor TEV de la serie AquaLab 4 (Decagon Devices Inc., Washington, EE. UU.) A 25°C. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Alveolado de miga. Se evaluaron los alvéolos de la miga de pan (ocho rebanadas por formulación) utilizando un sistema de análisis de imagen digital. Las rodajas se escanearon (600 puntos por pulgada) con un escáner HP 3515 y se procesaron con el software ImageJ. Las imágenes se transformaron en una imagen de 8 bits (gris) y se binarizaron mediante el algoritmo Isodata (umbral 157). Los puntos negros eran alvéolos y el umbral alveolar era 0,005 cm^2. Se calculó el número de alvéolos por área (N) (alvéolos / cm^2) y el área total ocupada por alvéolos (%).

Textura de miga de pan. El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó sobre discos de miga (alto: 2 cm, diámetro: 3 cm) a 20°C. Se utilizó un equipo CT3 Texture Analyzer (Modelo CT3-100, Brookfield Engineering Laboratories, EE. UU.) Con una celda de carga de 25 kg. Se utilizó un doble ciclo de compresión hasta el 40% de la altura original con una sonda cilíndrica (diámetro: 2,5 cm) y una velocidad de ensayo de 0,5 mm / s. Se calculó la firmeza, resiliencia, masticabilidad, cohesión y elasticidad. Se analizaron ocho migas por cada formulación.

Ensayos de relajación. La relajación del estrés de la miga se realizó sobre discos de pan (altura: 1 cm; diámetro: 3 cm) en un texturómetro CT3 (Brookfield Engineering Laboratories, EE. UU.). Las muestras se comprimieron (0,5 mm / s) hasta un 40% de la altura original y se mantuvo la compresión durante 1 min (Sonda: TA11 / 1000, d: 2,5 cm). La curva de la fuerza registrada en función del tiempo, se ajustó (Xiong *et al*., 2015) con la ecuación (4)

$$\sigma\ (t) = \varepsilon_0\ E_0 + \varepsilon_0\ E_1 \exp\ (-t/T) \quad (4)$$

$$\eta = E_1 T \quad (5)$$

Donde σ (t) es la tensión (fuerza / área) en cualquier momento t; ε_0 es la deformación por compresión (40%); E_0 y E_1 son los módulos elásticos de equilibrio y decaimiento, respectivamente; T el valor del tiempo de relajación; η la viscosidad de la miga de pan. Los ensayos se realizaron a 25°C por duplicado (n=4).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron con un análisis bifactorial utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al*., 2012) y las medias se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Duncan a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

3. Resultados y Discusión

En cuanto al proceso de fermentación de las masas, en la Figura 1a se observa como las masas sin amaranto (C) y con 5% de amaranto sin germinar (A5) presentaron durante la fermentación, curvas sigmoides similares y que a tiempos de fermentación bajos (<85 min), un menor incremento de volumen (ΔV) que las masas conteniendo 15% (A15) y 25% (A25) de harina de semillas de amaranto sin germinar. Además, las masas A15 y A25 presentaron curvas similares pero con crecimiento exponencial. En los tiempos de fermentación bajos, la masa con mayor contenido de harina de amaranto fermentó más fácilmente, eso se puede deber a la presencia de azúcares simples disponibles para ser utilizados por las levaduras. A los 85 min se observó cómo se cruzaron las curvas y las masas C y A5 presentaron valores marcadamente superiores a los de A15 y A25, con un crecimiento sostenido en el caso de la muestra C. Mientras que, las masas A15 y A25 presentaron una meseta después de los 150 min, lo que sugiere que el proceso de fermentación se completó. El cambio en la forma de la curva para el 15% y el 25% podría estar relacionado con la dilución de las proteínas del gluten; cambio que también

podría atribuirse a las proteínas globulares del amaranto que serían capaces de retener agua, disminuyendo la dureza y elasticidad de la masa, favoreciendo su expansión pero con un volumen reducido. Además, la fibra dietética de amaranto interferiría con la matriz del gluten.

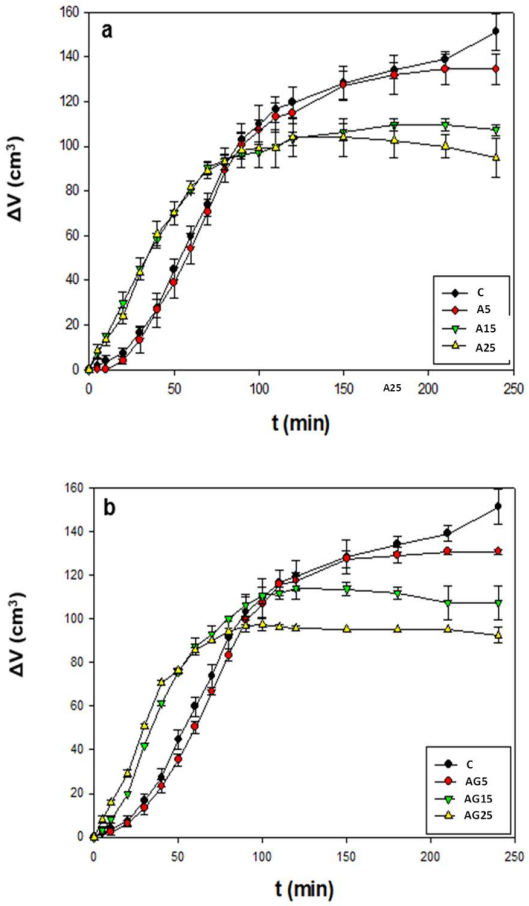


Figura 1. Curvas de fermentación de las masas. (a) Masa con harina de trigo (C) y diferentes niveles de harinas de amaranto no germinado: 5% (A5); 15% (A15) y 25% (A25). (b) Masa con harina de trigo (C) y masa con diferentes niveles de harina de amaranto germinado: 5% (AG5), 15% (AG15) y 25% (AG25).

Por su parte, en la Figura 1b se observa como a tiempos bajos de fermentación, las curvas de las masas con amaranto germinado fueron similares a las masas con amaranto sin germinar (Figura 1a). En los tiempos más largos de fermentación (> 100 min), AG5 continuó aumentando ΔV mientras que AG15 y AG25 presentaron una meseta. Los valores finales de ΔV hacia el final del ensayo disminuyeron a medida que aumentaba la cantidad de harina de AG en la mezcla.

Por otro lado, los parámetros obtenidos de la ecuación (1) se muestran en la Tabla 1. Los valores de volumen máximo (V_{max}) disminuyeron significativamente con el incremento de la harina de amaranto (A), sin diferencias significativas entre A15 y A25. La constante cinética (b), relacionada con la velocidad de fermentación, se mantuvo constante hasta un 15% y aumentó significativamente para A25, a su vez resultó significativamente mayor para AG15 y principalmente para la masa AG25 con respecto a la masa de trigo (C) y a la masa A15 y A25 . Los valores de ΔV más bajos observados después de 100 min en la masa AG25 (Figura 1b) también se reflejaron en V_{max} (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del modelado de curvas de fermentación de masa.

Formulación	V_{max} (cm³)	b (min⁻¹)	c	t_f (min)
C	146 ± 5 ^{d}	0,02 ± 0,00 ^{a}	3,4 ± 0,5 ^{b}	102 ± 2 ^{e}
A5	135 ± 6 ^{c}	0,03 ± 0,00 ^{ab}	4,9 ± 0,8 ^{c}	94 ± 3 ^{d}
A15	109 ± 2 ^{b}	0,03 ± 0,00 ^{a}	1,5 ± 0,2 ^{a}	63 ± 2 ^{c}
A25	102 ± 6 ^{ab}	0,04 ± 0,01 ^{bc}	2,2 ± 0,4 ^{ab}	54 ± 2 ^{b}
AG5	132 ± 2 ^{c}	0,03 ± 0,00 ^{ab}	5,8 ± 0,7 ^{c}	94 ± 1 ^{d}
AG15	112 ± 4 ^{b}	0,04 ± 0,00 ^{c}	3,0 ± 0,2 ^{b}	57 ± 2 ^{b}
AG25	94 ± 4 ^{a}	0,06 ± 0,01 ^{d}	2,6 ± 0,8 ^{ab}	42 ± 3 ^{a}

Formulación con diferentes niveles de harinas de amaranto: no germinado: 0% (C), 5% (A5), 15% (A15) y 25% (A25); muestras germinadas: 5% (AG5), 15% (AG15) y 25% (AG25). Parámetros: V_{max}, b y c son constantes y tf es el tiempo de fermentación. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores se expresan como media ± DE.

El parámetro c aumentó significativamente con un 5% (A, AG5), mientras que experimentó una gran disminución al 15% (A15, AG15) y se mantuvo constante con un 25% (A25, AG25) de harina de amaranto. El tiempo de fermentación (tf) disminuyó significativamente con la adición de harinas de amaranto (Tabla 1), principalmente en AG25 cuyo tf fue significativamente menor que el de A25. Los resultados sugieren que la germinación generó nuevos componentes, principalmente azúcares a partir de carbohidratos que potencian la fermentación de la levadura, acelerando este proceso (b alto, c bajo y tf bajo). En este sentido, los sustratos preferidos de la levadura *Saccharomices cereviceae* son en una primera instancia glucosa y fructosa libres, y luego la invertasa presente en la levadura convierte la sacarosa en glucosa y fructosa que son transportadas y metabolizadas por la levadura (Struyf *et al*., 2017). A diferencia de la harina no germinada que tiene 1% de glucosa, 0,1% de fructosa y 1,8% de sacarosa, la harina germinada contiene 10 veces más fructosa y 5 veces más glucosa que se consumen al comienzo de la fermentación.

En lo que respecta a la calidad del pan, en la figura 2a se muestra el volumen específico (V_{esp}) de los panes. Se observó una disminución significativa en los panes con un 15% y un 25% de harina de amaranto sin germinar (Figura 2). En el caso de los panes con AG (Figura 2), el V_{esp} de AG5 aumentó significativamente, pero luego para AG15 y AG25 disminuyó a valores ligeramente superiores a los de los panes A; por lo tanto, la germinación condujo a un mayor volumen de pan.

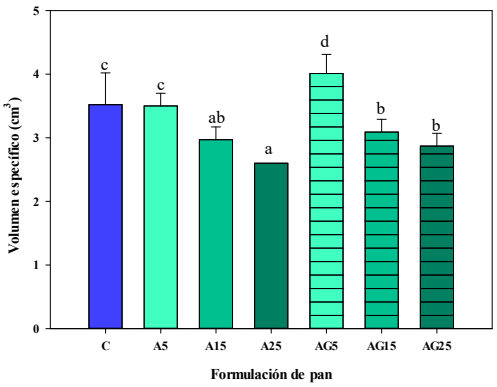


Figura 2. Volumen específico de los panes. Pan de trigo sin amaranto (C). Niveles de harina de amaranto: 5% (A5 y AG5), 15% (A15 y AG15) y 25% (A25 y AG25). Panes con harina no germinada (A) y con harina de amaranto germinada (AG). Letras diferentes en la misma figura indican diferencias significativas (p <0.05).

Una disminución del V_{esp} en los panes A y AG está directamente relacionada con los valores más bajos de V_{max} observados, debido a la dilución de las proteínas del gluten y la incorporación de fibra a través de la harina de amaranto. A pesar de que los valores de ΔV para AG25 fueron ligeramente más bajos con respecto a los de la masa A25, los valores del V_{esp} de dichos panes fueron más altos. En la masa AG25, debido al alto contenido de azúcares, la levadura produjo una gran cantidad de dióxido de carbono durante el inicio de la cocción, lo que provocó una mayor expansión de la masa AG25.

Otro parámetro de calidad es el índice de pardeamiento (IP) de la corteza de los panes, dicho parámetro se muestra en la Figura 3. Los panes con ambos tipos de harina de amaranto presentaron mayor índice de pardeamiento (IP) que el pan C; y sin diferencias significativas con el nivel de harina para los panes A. En el caso de los panes con amaranto germinado, el IP también aumentó con la cantidad de harina germinada; el valor más alto se observó para el pan AG25. Los valores sugieren que las moléculas de bajo tamaño, que se generan por proteólisis e hidrólisis del almidón durante la germinación de las semillas de amaranto, participan en la reacción de Maillard, favoreciendo la formación de pigmentos marrones en la corteza del pan; efecto que se potencia con la adición de una mayor proporción de harina de semillas germinadas.

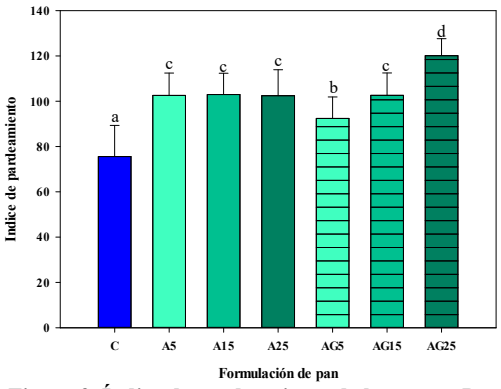


Figura 3. Índice de pardeamiento de los panes. Pan de trigo sin amaranto (C). Niveles de harina de amaranto: 5% (A5 y AG5), 15% (A15 y AG15) y 25% (A25 y AG25). Panes con harina no germinada (A) y con harina de amaranto germinada (AG). Letras diferentes en la misma figura indican diferencias significativas (p <0.05).

Un buen volumen, un color pardusco y una miga esponjosa se relacionan con una buena calidad panadera. La esponjosidad de la miga está relacionada con la humedad y la aireación o los alvéolos generados por la producción de dióxido de carbono durante la fermentación de la masa. La matriz de masa que rodea a las burbujas de gas se fija durante la cocción formando la red de miga en el pan. La humedad de la miga de C fue 45,9% 0,6% y no se observaron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones de amaranto (45,0 ± 0,2–45,9 ± 0,1%). El valor de la actividad acuosa de la miga de C fue 0,966 ± 0,001 y las migas con amaranto arrojaron valores similares: 0,966-0,969; por lo tanto, las propiedades de hidratación del pan no cambiaron con la harina de amaranto.

Las migas y los parámetros alveolares de los diferentes panes se muestran en la Figura 4. El número de alvéolos aumentó significativamente con el nivel de harina de amaranto, especialmente en los panes con harina de amaranto sin germinar. Aunque para las migas con AG el número de alvéolos fue ligeramente menor, el área ocupada por ellos fue significativamente similar a la de las migas con A, sugiriendo que hay menos alvéolos pero con un tamaño mayor, lo que conduce a una miga con una baja proporción de pared alveolar y posiblemente más blanda.

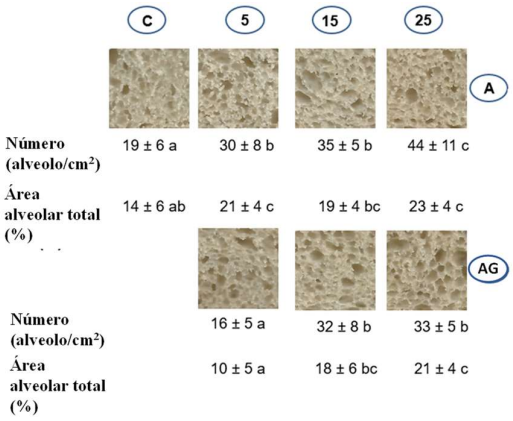


Figura 4. Aspecto de la miga de pan, y valores (media ± DE) del número de alvéolos por área y área total ocupada por alvéolos totales. Formulaciones de pan: muestras sin germinar: 0% (C), 5% (A5), 15% (A15), 25% (A25); muestras germinadas: 5% (AG5), 15% (AG15), 25% (AG25). Diferentes letras en el mismo parámetro indican diferencias significativas (p < 0,05).

Respecto a las propiedades reológicas de las migas, en la Figura 5 se muestran los parámetros de textura de los panes. La firmeza de la miga aumentó gradualmente para A5 y A15, siendo más pronunciado en A25 (Figura 5A). Este gran aumento de dureza para A25 podría deberse a la formación de una miga más compacta que corresponde a un mayor número de pequeños alvéolos distribuidos en un área total, área que es igual a la encontrada en las migas de A5 y A15. Las migas de los panes con cantidades intermedias de harina A (A5 y A15) presentaron un valor de firmeza ligeramente mayor que el de la miga de pan C, a pesar de tener un mayor número de alvéolos y un área total más grande ocupada por ellos, es decir, una miga más aireada que debería producir una miga más suave. Este comportamiento sugiere que la parte sólida de la miga tiene una estructura más firme y compacta. En el caso de los panes con AG, en AG5 se observó una firmeza significativamente menor que la miga C y aumentó con la adición de 15 y 25% de harina de amaranto germinada, alcanzando el valor de firmeza del pan C (Figura 5A). No se observaron diferencias significativas en la firmeza entre AG15 y AG25. Los resultados sugieren que durante la germinación las proteasas y amilasas hidrolizan las proteínas y el almidón, liberando moléculas más pequeñas que interactúan con las proteínas del trigo formando una red de gluten más flexible que conduce a una miga más aireada, con alveolos de gran tamaño y, por lo tanto, de baja firmeza.
La resiliencia es una medida de cómo se recupera un alimento después de la deformación; los valores de dicho parámetro fueron menores a 0.5 y se observó una disminución gradual al aumentar el nivel de ambos tipos de harinas de amaranto (Figura 5B), observándose el menor valor para GA25. Este resultado indica que la harina de amaranto germinado no puede contribuir a la recuperación de la estructura de la miga después de la deformación aplicada, lo que podría estar relacionado con la presencia de una baja cantidad de proteínas de gran tamaño, como consecuencia del proceso de germinación, que son las que confieren propiedades elásticas.

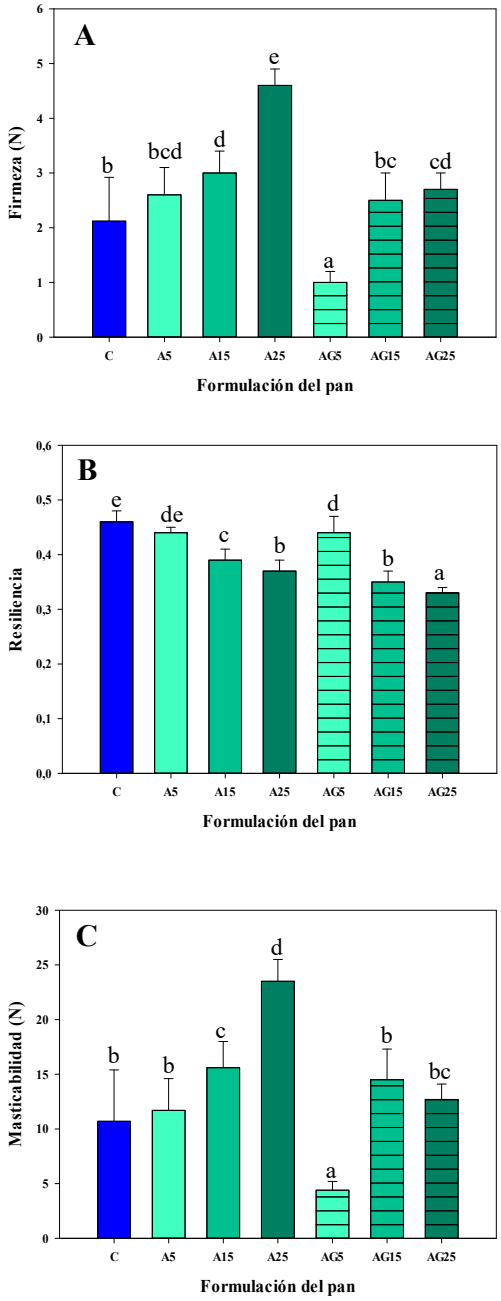


Figura 5. Parámetros de textura de los panes de harina de trigo con amaranto germinado y sin germinar. a) Firmeza, b) Resiliencia y c)

Masticabilidad. Niveles de harina de amaranto: muestras no germinadas: 0% (C), 5% (A5), 15% (A15), 25% (A25); muestras germinadas: 5% (AG5), 15% (AG15), 25% (AG25). Letras diferentes indican diferencias significativas (p <0,05).

En el caso de la masticabilidad (Figura 5C) todas las migas de los panes de amaranto-trigo presentaron el mismo comportamiento que el observado para la firmeza (Figura 5A). Por su parte, no hubo diferencias significativas en la cohesividad, elasticidad y adhesividad de las migas. Los valores de cohesividad variaron entre 0,66 (AG25) y 0,73 (C, A5, AG5), mientras que los valores de elasticidad variaron entre 6,3 (A5) y 7,4 mm (A15 y A25) y los de adhesividad se mantuvieron en el rango de 0,1-0,3.

Por otro lado, la relajación es un fenómeno relacionado con la reorientación molecular del sistema en el tiempo que conduce a cambios estructurales. Bajo deformación constante, la conformación de las cadenas de moléculas de almidón ya gelatinizado y proteínas desnaturalizadas durante el horneado cambiaría, modificando su distribución en el espacio disponible, lo que llevaría a una disminución del esfuerzo. En un sólido viscoelástico, la tensión decae hasta un valor de equilibrio y la curva se puede tratar matemáticamente con el modelo de Maxwell generalizado. Las curvas de relajación de la masa presentan tres zonas: (i) una primera de gran decaimiento donde los parámetros E_1 y T_1 gobiernan la relajación al inicio de la deformación y se atribuyen a la orientación de moléculas de bajo tamaño, (ii) una zona intermedia donde E_2 y T_2 representan la relajación de moléculas poliméricas y (iii) la zona de equilibrio con valor constante de tensión con E_3 representando el módulo elástico del estado de equilibrio. El tiempo de relajación ($T = \eta / E$) está relacionado con el grado de relajación: un valor alto de T implica un componente más viscoso y una muestra más relajada. La relajación de las migas se puede describir con un modelo más simple que la masa, debido a sus estructuras más rígidas. Xiong *y col*. (2015) aplicaron el modelo de Maxwell de un término previamente utilizado por Xu *et al.* (2007) a las curvas de relajación de migas de tortas de arroz fermentadas con *Brettanomyces custersii*. El horneado fija la estructura de la miga de pan e inmoviliza ambos tipos de componentes: los grandes polímeros que forman la estructura de la red (proteínas y almidón) y las pequeñas moléculas que interactúan con ellos. Esta reducción de la movilidad de la matriz permite la aplicación de un solo elemento Maxwell en el modelado de la curva de relajación. En la Tabla 2 se muestran diferentes parámetros de relajación de la miga.

Tabla 2. Parámetros obtenidos del ensayo de relajación de las migas de pan.

Formulación	E_1 (kPa)	T_1 (s)	E_0 (kPa)
C	56 ± 8 ^{bc}	11,6 ± 0,3 ^{d}	56 ± 8 ^{c}
A5	48 ± 10 ^{b}	11,3 ± 0,4 ^{cd}	44 ± 7 ^{b}
A15	59 ± 10 ^{c}	10,7 ± 0,5 ^{a}	51 ± 8 ^{c}
A25	129 ± 6 ^{d}	10,5 ± 0,2 ^{a}	92 ± 7 ^{d}
AG5	22 ± 6 ^{a}	11,3 ± 0,5 ^{bc}	18 ± 4 ^{a}
AG15	67 ± 8 ^{c}	10,8 ± 0,2 ^{ab}	49 ± 4 ^{bc}
AG25	67 ± 8 ^{c}	10,7 ± 0,3 ^{a}	49 ± 4 ^{bc}

Formulación de pan con diferentes niveles de harinas de amaranto: no germinado: 0% (C), 5% (A5), 15% (A15) y 25% (A25); germinado: 5% (AG5), 15% (AG15) y 25% (AG25). Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05). Los valores se expresan como media ± DE.

El módulo de elasticidad E_1 no cambió significativamente en las migas con A en comparación con C hasta un 15%, pero aumentó considerablemente para la miga de A25. Este comportamiento sugiere que grandes cantidades de harina de amaranto sin germinar dan lugar a estructuras más compactas con baja relajación (baja T_1). Los valores de E_0 fueron similares a E_1 y mostraron la misma tendencia con la adición de cantidades crecientes de harina de amaranto no germinada (Tabla 2). Las migas de los panes preparados con harina de amaranto germinado (AG) presentaron un comportamiento diferente al de las migas A. Para AG5 se observó una disminución significativa en E_1 y E_0 (Tabla 2); esta gran disminución fue consistente con el V_{esp} más alto y la firmeza y masticabilidad de la miga más bajas obtenidas para este pan. En el caso de las migas de AG15 y AG25, ambos módulos elásticos (E_0 y E_1) aumentaron sin que se observaran diferencias significativas entre ellos (Tabla 2). Este aumento significativo de los módulos elásticos, acompañado de una menor viscosidad de la miga (valores constantes de T_1), sugiere que la mayor proporción de moléculas de proteínas poliméricas que no se vieron modificadas por la germinación podrían haber contribuido a este aumento. Las proteínas globulares de amaranto contribuyen a generar una matriz más elástica, probablemente debido a una mayor retención de agua, lo que conduce a la gelificación de las proteínas, principalmente después del proceso de cocción. Este aumento de los módulos de elasticidad de la miga también estuvo acompañado por el aumento de la masticabilidad y firmeza, aunque con la presencia de alvéolos de mayor tamaño.

El tiempo de relajación T_1 no cambió, con respecto a la miga C, para la miga A5; se observó una leve disminución con niveles altos de A; los valores promedio fueron alrededor de 10 s (Tabla 2).

4. Conclusiones

La incorporación de harinas de semillas de amaranto germinadas o no germinadas a la harina de trigo modificó la calidad tecnológica de los panes con respecto al pan de trigo. La masa con un 25% de harina de amaranto germinada fue la que fermentó más rápido debido a la presencia de un alto contenido de sustratos importantes para la fermentación. Los panes AG25 presentaron mayor volumen específico y fueron más oscuros. Además, la miga de AG25 contenía un alto número de alvéolos por unidad de área y un área alveolar total mayor que la miga de pan de trigo. La miga de AG25 presentó una firmeza similar a la del pan de trigo. En cuanto a las propiedades de relajación, la miga AG25 exhibió características viscoelásticas similares a las de la miga del pan de trigo. En resumen, se puede concluir que el pan con un 25% de harina de amaranto germinado presentó las mejores características de horneado y calidad tecno-funcional.

5. Referencias

Cornejo, F., Novillo, G., Villacrés, E., & Rosell, C. M. (2019). Evaluation of the physicochemical and nutritional changes in two amaranth species (Amaranthus quitensis and Amaranthus caudatus) after germination. Food Research International, 121, 933-939.

Guardianelli, L. M., Salinas, M. V., & Puppo, M. C. (2019a). Chemical and thermal properties of flours from germinated amaranth seeds. Journal of Food Measurement and Characterization, 13(2), 1078-1088.

Guardianelli, L. M., Salinas, M. V., & Puppo, M. C. (2019b). Hydration and rheological properties of amaranth-wheat flour dough: Influence of germination of amaranth seeds. Food hydrocolloids, 97, 105242.

American Association of Cereal Chemists (AACC International). (2000), 10° Ed. St. Paul, MN: The American Association of Cereal Chemists, Inc.

Saricoban C and Tahsin Yilmaz M. (2010). *Modelling the effects of processing factors on the changes in color parameters of cooked meatballs using response Surface methodology.* World Applied Sciences Journal 9(1): 14–22.

Xiong Q, Hu T, Zhao S and Huang Q. (2015). *Texture and flavor characteristics of rice cake fermented by Brettanomyces custersii ZSM-001*. Journal of Food Science and Technology 52(11): 7113–7122.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, Y. C. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar, 8, 195-199.

Struyf N, Van der Maelen E, Hemdane S, Verspreet J, Verstrepen KJ and Courtin CM. (2017). *Bread dough and baker's yeast: An uplifting synergy.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 16(5): 850–867.

Xu YL, Xiong SB and Zhao SM. (2007). *Effect of cooking technology and chemical components on stress-relaxation property of cooked rice.* Trans CSAE 23: 235–240.

09TCA - Masas congeladas para la obtención de panes dulces con incorporación de harina de fruto de algarrobo: Efecto del almacenamiento congelado sobre la calidad de los productos.

Frozen doughs to obtain sweet breads with the incorporation of mesquite flour: Effect of frozen storage on the quality of the products.

Facundo Bigne[1], Leda Gianuzzi[1], Cecilia Puppo[1,2], Cristina Ferrero[1].

1. CIDCA (Facultad de Ciencias Exactas-Universidad Nacional de La Plata-CONICET-CICPBA), La Plata, Argentina.
2. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. bignefacundo@gmail.com.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la aplicación de la tecnología de congelación-almacenamiento congelado-horneado de masas para la obtención de panes dulces “tipo panettone” a base de harinas de trigo y de fruto de algarrobo. Se realizaron medidas a diferentes tiempos de almacenamiento congelado durante un total de 12 semanas. Se evaluó la viabilidad de levaduras, la microestructura por Microscopía Electrónica Ambiental de Barrido y la calidad de los productos obtenidos en base a su relación altura / peso y la estructura y textura de la miga en los panes. Las masas presentaron una matriz de gluten de menor calidad conforme se incrementó el contenido de harina de fruto de algarrobo, sin embargo aquellas con mayor proporción de dicha harina sufrieron menor deterioro estructural con la congelación. Se observó una reducción de viabilidad de las levaduras con la congelación para las cuatro formulaciones. La calidad del producto final (altura / peso, estructura de miga y textura) se vio menos afectada por el proceso de congelación y almacenamiento de las masas en las formulaciones con mayor contenido de harina de fruto de algarrobo. Los panes dulces con incorporación de harina de fruto de algarrobo obtenidos a partir de masas congeladas y almacenadas por hasta 12 semanas mostraron una calidad similar a los obtenidos a partir de masa fresca.

Palabras clave: Panettone, Masas congeladas, Algarroba, Calidad panadera

Abstract

In the present work, the application of the bake-off technology of frozen doughs was evaluated to obtain "panettone-like" breads based on wheat and mesquite flours. Measurements were carried at different frozen storage times for a total of 12 weeks. Yeast viability, microstructure (by Environmental Scanning Electron Microscopy) and the quality of the final products (based on their height / weight ratio and the structure and texture of the crumb) were evaluated. Doughs showed a lower quality gluten matrix as the content of mesquite flour increased, however those with a higher proportion of this flour suffered less structural deterioration with freezing. A reduction in yeast viability was observed with freezing for all formulations. The quality of the final product (height / weight, crumb structure and texture) was less affected by the process of freezing and frozen storage of doughs in the formulations with a higher content of mesquite flour. The sweet breads with the incorporation of mesquite flour obtained from frozen dough and stored for up to 12 weeks showed a similar quality to those obtained from fresh dough.

Keywords: Panettone, Frozen doughs, Mesquite, Bread quality.

1. Introducción

La elaboración tradicional de panificados está siendo reemplazada (al menos parcialmente) por técnicas que permiten una producción simplificada, de acuerdo al comportamiento de la demanda, en los lugares de venta, como es el caso de la utilización de masas congeladas (Luo *et al*, 2018). Sin embargo, la congelación y el almacenamiento congelado de la masa puede llevar a la inhibición parcial de la actividad de las levaduras y la modificación de la estructura de la masa. Estos efectos adversos han

sido relacionados con la formación y crecimiento de cristales de hielo capaces de dañar la red de gluten y la viabilidad de las levaduras durante los mencionados procesos (Bárcenas y Rosell, 2006; Meziani *et al*., 2012).

Meziani *et al*. (2011) estudiaron el efecto de la velocidad de congelación sobre la estructura y reología de masas dulces para panificación. De dicho estudio concluyeron que las velocidades rápidas de congelación disminuyeron los efectos adversos generados por la formación y acción mecánica de los cristales de hielo sobre la estructura y propiedades viscoelásticas de las masas.

La incorporación de ciertos ingredientes, como harinas de leguminosas podrían tener un efecto protector sobre la estructura de la masa sometida a la congelación, según indicaron Simmons *et al*. (2012) con la incorporación de harina de soja desgrasada y la leche de soja en polvo en masas para panificación. Estos autores indicaron que la masa con incorporación de productos de soja retuvo mejor las características de calidad durante el almacenamiento congelado. Resultados similares informaron Ozulku y Arici (2017) sobre las propiedades reológicas de la masa y el volúmen específico de los productos finales en masas de garbanzo-trigo.

La harina de fruto de algarrobo se obtiene moliendo las vainas completas del árbol Prosopis spp., que pertenece a la familia de las leguminosas. Esta harina es de sabor agradable y dulce y se utiliza en muchos productos alimenticios tradicionales en diferentes países del continente americano. En un estudio previo se evaluó el efecto de la congelación y almacenamiento congelado sobre las propiedades de masas a base de harinas de trigo y de fruto de algarrobo (Bigne *et al*., 2019). En este se pudo verificar una atenuación de los efectos adversos generados por la congelación y almacenamiento congelado sobre las propiedades reológicas y microestructurales de las masas con incorporación de la harina de leguminosa.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos se presume que una selección adecuada de las condiciones de elaboración, congelación y almacenamiento de masas darían lugar a la obtención de productos "tipo panettone" con incorporación de harina de fruto de algarrobo de calidad comparable a aquellos elaborados a partir de masas frescas.

2. Materiales y métodos

Materiales

Se utilizó Harina de trigo (HT) tipo 000 (Molino Campodónico SA, La Plata, Argentina) con una composición (g/kg): 121,1 de proteínas; 13,2 de lípidos; 137,4 de humedad; 0,70 de minerales y 37,4 de fibra dietaria total. La harina de vaina de algarrobo (HA) se adquirió de productores locales (INTI ATUN, Santiago del Estero, Argentina) de la provincia de Santiago del Estero. Esta harina tiene un característico aroma dulce y un color marrón claro típico de las especies de algarrobo "blanco" (Prosopis alba) y presentó la siguiente composición (g/kg): 77,5 de proteínas; 13,3 de lípidos, 103,4 de humedad, 26,7 de minerales, 219,0 de fibra dietaria total, 447,7 de sacarosa, 32,2 de fructosa y 10,3 de glucosa. La composición de las harinas se determinó de acuerdo con los métodos aprobados por la AACC 46-12, 44-19, 8-1 y 32-05 para proteínas, humedad, cenizas y fibra dietética total, respectivamente (AACC, 2000); los lípidos se determinaron mediante extracción utilizando un dispositivo Soxhlet y los azúcares solubles se determinaron mediante HPLC. Para las formulaciones de masa y pan también se utilizó margarina (Dánica, Buenos Aires, Argentina), levadura fresca (Calsa, Buenos Aires, Argentina), huevos frescos y cloruro de sodio (Celusal, Vicente López, Argentina).

Formulación

En la Tabla 1 se resumen las formulaciones utilizadas para la elaboración de masas para obtener panes dulces sin harina de fruto de algarrobo (HA0) y con 15, 25 y 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de fruto de algarrobo (HA15, HA25 y HA35 respectivamente). Dichas formulaciones se ajustaron a través de ensayos preliminares (Bigne *et al*., 2018). La cantidad de azúcar para las formulaciones se redujo de acuerdo al incremento en el nivel de reemplazo de HT por HA debido al elevado contenido de azúcares que provee la HA.

Tabla 1. Formulaciones de pan dulce con distintos niveles de reemplazo de harina de trigo (HT) por harina de fruto de algarrobo (HA)

Componente	Formulación (g/ Kg de harina total)			
	HA0	HA15	HA25	HA35
HT	1000	850	750	650
HA	0	150	250	350
Agua	240	240	240	240
Azúcar	250	168	113	58
Margarina	200	200	200	200
Huevo líquido	170	170	170	170
Sal	10	10	10	10
Levadura fresca	30	30	30	30

Elaboración, congelación y almacenamiento de las masas

La levadura fresca se suspendió en 100 ml de agua a 30 °C con 10 g de azúcar. La harina (o mezcla de

harinas), sal, margarina fundida y el resto del azúcar se premezclaron durante 1 min en una amasadora planetaria (Kenwood, Treviso, Italia). Luego se añadió la suspensión de levadura, el huevo líquido y el resto del agua y se mezclaron durante 30 min a 90 rpm. La masa se dividió en porciones de 200 g que se dispusieron en bolsas de plástico individuales aptas para congelar. La congelación de las masas se llevó a cabo en una cámara con desplazamiento de aire forzado a -30 °C durante 120 min. El tiempo seleccionado fue suficiente para alcanzar una temperatura inferior a los -15 °C en el centro de cada pieza. Las bolsas con las masas se almacenaron en freezer a -20 °C durante 12 semanas.

Selección del método de congelación

Para la congelación de las masas se probaron 2 métodos, congelación en cámara a -30 °C con desplazamiento forzado de aire y congelación en freezer a -20 °C. En ambos casos se registró el descenso de temperatura con termocuplas tipo K a 1 cm del borde de las piezas y en el centro de las mismas. Los datos se analizaron y se calculó el tiempo necesario para alcanzar al menos -15 °C en toda la masa (temperatura inferior al punto de fusión del agua en las muestras). En base a los resultados se seleccionó el método de mayor velocidad de enfriamiento.

Microscopía Ambiental Electrónica de Barrido (ESEM)

Las masas preparadas como se indicó anteriormente pero sin agregado de levadura (para evitar la actividad de las mismas y modificaciones durante las mediciones) fueron caracterizadas por ESEM a tiempo 0 (masa fresca sin congelar) y luego de 12 semanas de almacenamiento congelado.

Porciones de masa de aproximadamente 0,1 g fueron colocadas sobre soportes específicos para su observación en un microscopio FEI Quanta 200 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU) a 10 °C y 4,14 Torr de presión. Se adquirieron micrografías de varios campos de cada muestra a diferentes aumentos (entre X800 y X5000).

Viabilidad de levaduras

El recuento de levaduras fue evaluado por duplicado en las masas frescas (sin congelar) y luego de 2, 4, 8 y 12 semanas de almacenamiento congelado después de ser descongeladas por 45 min a 30 °C. Para ello, se tomó 1 g de muestra, (fresca y descongelada) y se realizaron diluciones decimales seriadas empleando agua peptona 0,1%. Seguidamente, se sembró 100 µl de las diluciones sobre placas de agar YGC (Yeast Glucosa Cloranfenicol) empleando perlas de vidrio para su dispersión en la superficie. Las placas fueron incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 días, luego del cual se contaron las colonias y los resultados se expresaron en log de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g).

Elaboración de los panes

Las masas almacenadas en freezer de dejaron descongelar a temperatura ambiente durante 2 h para ser leudadas y cocidas, mientras que las masas frescas (sin congelar) se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente antes de proceder a su leudado y cocción

Las piezas de masa de 200 g se colocaron en moldes cilíndricos de 10 cm de diámetro y 15 cm de alto y se llevaron a cámara de fermentación (Brito Hnos., Los Polvorines, Argentina) a 30 °C durante tiempo óptimo de leudado para cada formulación, determinado en ensayos previos (Bigne *et al*., 2018). Dichos tiempos fueron 320,5 min, 293,7 min, 285,7 min y 231,1 min para las masas sin harina de fruto de algarrobo y con 15, 25 y 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de fruto de algarrobo. Luego del proceso de fermentación, las masas leudadas en sus respectivos moldes se hornearon durante 40 min a 180 °C en horno eléctrico (Ariston, Fabriano, Italia).

Evaluación de la calidad panadera

Luego del horneado las piezas se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 1 h, se desmoldaron y se midieron la relación altura/peso, estructura de miga, textura de miga y humedad de miga según se describe a continuación.

Relación altura/peso de las piezas
Para evaluar el incremento de volumen de las piezas se midió la altura desde la base de los panes hasta el centro de la parte superior de los panes y el peso de los mismos. A partir de ello se calculó la relación altura/peso.

Estructura de la miga
Se fotografiaron rodajas de la parte media de los panes, se tomaron imágenes de 5 cm x 5 cm y se analizaron las con el software ImageJ 1.48q para obtener tamaño medio, área ocupada y circularidad de los alvéolos (Bigne *et al*., 2018). Para estas medidas, se fijó un límite inferior para el tamaño de alvéolo de 0,2 mm2. Los alvéolos con tamaños superiores a 30 mm2 fueron descartados para el cálculo del tamaño medio y la circularidad.

Humedad miga

Las muestras de miga se secaron en estufa a 103 °C hasta peso constante según el método oficial AACC 44-15A.

Textura miga
Se utilizó un analizador de textura Brookfield CT3-100 (Brookfield Engineering Laboratories, EEUU) equipado con una celda de carga de 25 Kg. Se cortaron discos de miga de 30 mm de diámetro y 20 mm de espesor y se sometieron a dos compresiones consecutivas (5 s de tiempo de recuperación entre compresiones) hasta el 40% de la altura inicial, utilizando una sonda plana TA25/1000 con una velocidad de compresión de 0,5 mm/s. Se registraron medidas de fuerza en función del tiempo y se analizaron los perfiles de textura para obtener los parámetros de dureza (fuerza máxima en el primer pico), elasticidad (relación entre la distancia correspondiente a la segunda compresión y la distancia de compresión original), resiliencia (relación entre el área correspondiente a la retirada de la primera compresión y el área de la primera compresión), cohesividad (área del segundo pico con respecto al área del primer pico) y masticabilidad (calculado como el producto de dureza, cohesividad y elasticidad).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion XV v15.2.06 (StatPoint Inc.). Se aplicaron pruebas de Fisher-LSD para determinar las diferencias significativas entre medias con un nivel de confianza del 95%.

3. Resultados y Discusión

Evaluación del método de congelación

En la Figura 1 se muestran las curvas típicas de descenso de temperatura en función del tiempo en cámara a -30 °C con movimiento forzado de aire y en freezer a -20 °C en el centro de las masas. En ambos casos se observa un semi-plateau de temperatura cercano a -9,2 °C que corresponde a la congelación del agua libre de las muestras. El descenso crioscópico para la temperatura de congelación del agua en estas muestras es atribuible principalmente a su elevado contenido de azúcares solubles. Maziani *et al.* (2012) informaron temperaturas de congelación cercanas a -7,5 °C para masas dulces con 200 g de azúcar cada 1000 g de harina. Es presumible un descenso mayor para la temperatura de congelación en las masas aquí evaluadas donde el contenido de azúcares es de 240 g cada 1000 g de harina.

Teniendo en cuenta estas observaciones se tomó la temperatura de -15 °C como aquella para asegurar una congelación de la mayor parte del agua presente en las muestras a almacenar. Los datos de temperatura en función del tiempo una vez superado el semi-plateau se ajustaron con una ecuación de decaimiento exponencial y a partir de ellos se calcularon los tiempos necesarios para alcanzar la temperatura de -15 °C. Los tiempos promedio (± DE) fueron de 165 ± 14 min para el enfriamiento en freezer y 95 ± 14 min para el enfriamiento en cámara con ventilación forzada de aire.

A partir de estos datos y privilegiando un enfriamiento rápido de las masas, para prevenir daños en la estructura causados por la formación de cristales de hielo de mayor tamaño (Meziani *et al*., 2011), se seleccionó el enfriamiento en cámara a -30 °C con ventilación forzada de aire durante 120 min para asegurar que las masas alcancen una temperatura inferior a -15 °C antes de ser almacenadas en freezer a -20 °C.

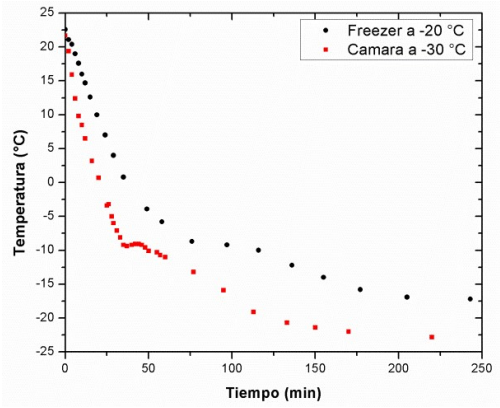


Figura 1. Curvas típicas de congelación de masa en freezer (-20 ºC) y cámara (-30 ºC)

Caracterización microestructural de las masas

En la Figura 2 se muestran las micrografías obtenidas por ESEM para las masas antes del tratamiento de congelación (A, C, E y G) y luego de 12 semanas de almacenamiento congelado (B, D, F y H) sin HA y con 15, 25 y 35% de reemplazo de HT por HA, respectivamente.

Es posible apreciar algunas diferencias estructurales entre las masas sin congelar con diferentes niveles de reemplazo de HT por HA, HA0, HA15 HA25 y HA35 (Fig. 4A, C, E y G respectivamente). Cuando se incrementó el contenido de HA, la red de gluten resultó menos uniforme, con menos proporción de películas de gluten y más proporción de fibras de gluten. El desarrollo de una red de gluten adecuada, caracterizada por la formación de películas y un alto grado de entrecruzamiento de proteínas, es la causa

de las propiedades elásticas de la masa de trigo (Correa *et al*., 2014).

En las micrografías de la Fig. 2B, D, F y H, se muestran las masas correspondientes a HA0-HA35

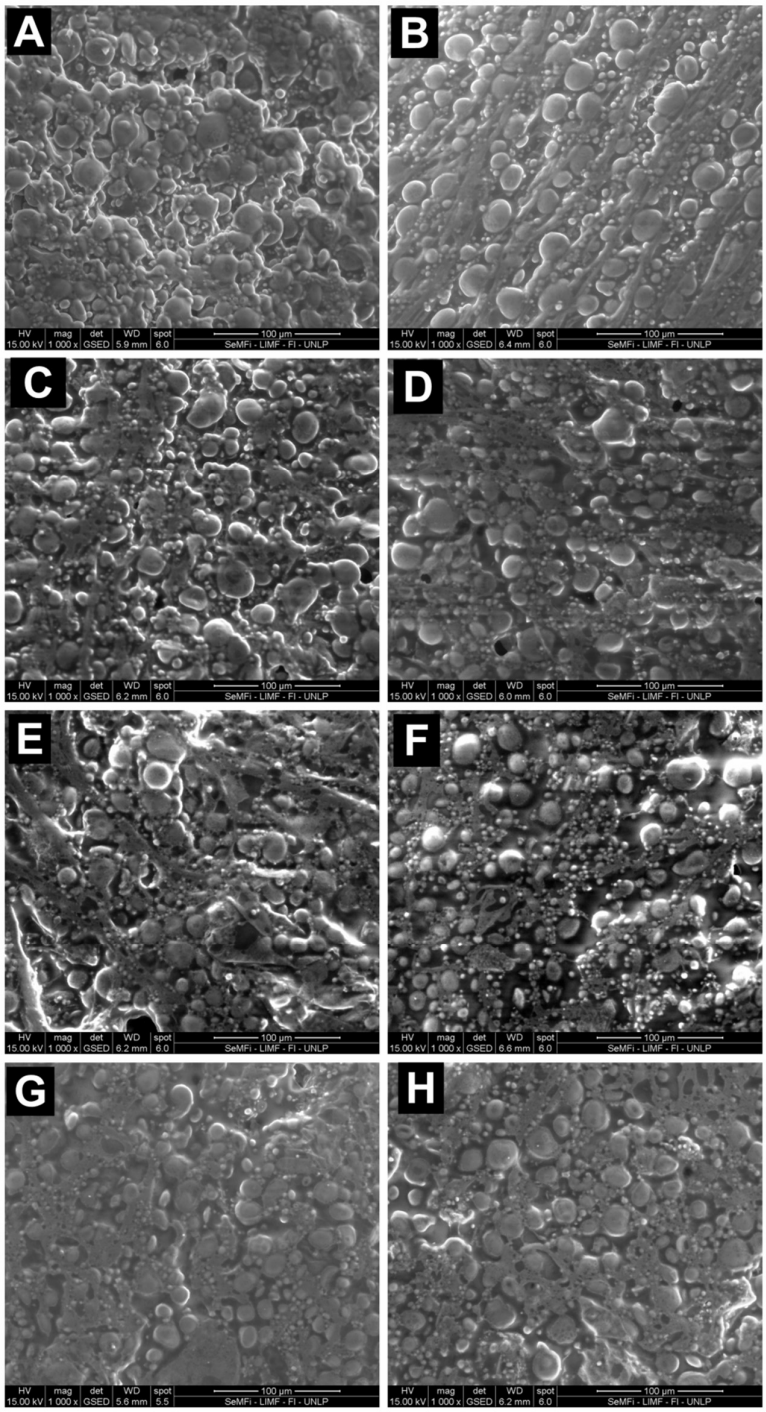


Figura 2. Micrografías obtenidas por ESEM de masas antes del tratamiento de congelación (A, C, E y G) y luego de 12 semanas de almacenamiento congelado (B, D, F y H). A, B: sin HA; C,D: con 15% de HA; E,F: con 25% de HA; G,H: con 35% de HA.

después de 12 semanas de almacenamiento congelado. Para HA0, se puede observar agregación de proteínas en forma de fibras gruesas (Fig. 4B) en contraste con la apariencia de la masa fresca (Fig. 4A) donde las películas cubrían una gran parte de la superficie de los gránulos de almidón. También son

visibles fibras gruesas similares en las masas con combinación de harinas después de la congelación (Fig. 2D, E y H), especialmente en HA35.

Sin embargo puede observarse que los cambios con la congelación y almacenamiento congelado resultan más evidentes en las formulaciones con menor contenido de HA (HA0 y HA15). Los cambios estructurales pueden estar relacionados con cambios en la distribución del agua durante el almacenamiento congelado y después de la descongelación. En este sentido, Esselink y van Duynjoven (2003) demostraron que el gluten se deshidrataba durante la congelación y almacenamiento congelado, provocando cambios en la distribución del agua después de la descongelación. Baier-Schenk *et al*. (2005) indicaron que el crecimiento de cristales de hielo conduce a la redistribución del agua congelada, con una deshidratación parcial de la matriz polimérica de la masa (particularmente del gluten), que afecta las propiedades del gluten y, en consecuencia, el rendimiento de horneado de la masa.

Viabilidad de levaduras con el almacenamiento congelado

En la Figura 3 se observa el efecto de la congelación y almacenamiento congelado sobre la viabilidad de las levaduras. Se observa una pérdida de alrededor de un orden logarítmico en la primera etapa de lo que se puede deducir que se debe, fundamentalmente al efecto de la congelación. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de los recuentos de levaduras en las masas elaboradas con las distintas formulaciones.

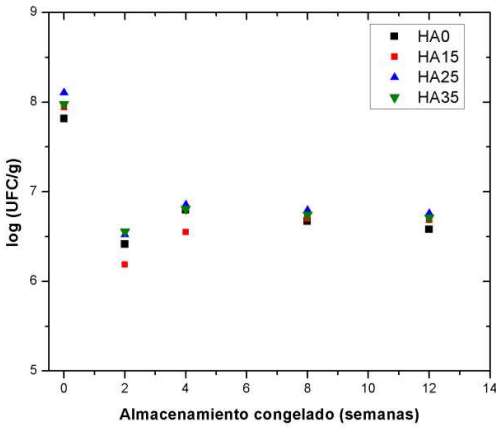


Figura 3. Recuento de levaduras después de la congelación y distintos tiempos de almacenamiento congelado

Estos resultados son coincidentes con los de Ribotta *et al*. (2003) quienes incorporaron levadura fresca prensada en masa para panificación a base de harina de trigo y luego fue congelada. Sus resultados indicaron que al aumentar el tiempo de almacenamiento congelado disminuyeron las células viables en un 52,4% a los 90 días.

Durante el proceso de producción de masas congeladas se somete a las levaduras a estrés por congelación y estrés osmótico, debido a la reducción en el potencial hídrico de la masa, que es incluso mayor en masas dulces congeladas. La exposición de células de levadura a alta presión osmótica resulta en una deshidratación celular que limita su crecimiento y capacidad de producción de C02. La cantidad de células viables depende del tipo de cepa y del estado fisiológico de la levadura. La reproducción de las células también difiere con la cantidad de azúcares fermentables disponibles para las células. Después de un prolongado almacenamiento en congelación, la viabilidad de la levadura decrece dramáticamente (Oda *et al*., 1986; Codón *et al*., 2003).

Calidad de los productos obtenidos

Los valores promedio de Altura/peso, área media de alveolos, porcentaje de área ocupada por alveolos y circularidad alveolar para los panes obtenidos a partir de masa fresca y de masa congelada y almacenada durante 12 semanas se resumen en la Tabla 2.

La relación altura/peso se redujo de forma significativa ($p < 0,05$) a medida que se incrementó el reemplazo de HT por HA para los panes dulces obtenidos con las masas frescas. Con la congelación y almacenamiento de las masas se observaron 2 tendencias diferentes de acuerdo al grado de reemplazo de HT por HA: en las formulaciones HA0 y HA15 se observó una disminución de la relación altura/peso en los panes luego de la congelación ($p < 0,05$) y una estabilización de la misma durante el almacenamiento congelado; por otro lado en las formulaciones con mayor contenido de HA (HA25 y HA35) la relación altura/peso de los panes obtenidos no arrojó diferencias significativas ($p > 0,05$) tras la congelación-almacenamiento congelado de la masa.

Tendencias similares se observaron en la estructura de la miga de los panes. Para las piezas obtenidas a partir de masa fresca (sin congelación) el tamaño medio, el porcentaje de área ocupada y la circularidad de los alvéolos se redujo al incrementar el reemplazo de HT por HA. Luego del proceso de congelación-almacenamiento y cocción de las masas, los 3 parámetros estructurales analizados permanecieron inalterados ($p > 0,05$), respecto a los de panes obtenidos a partir de masa fresca, para las formulaciones con mayor contenido de HA (HA25 y

HA35). En las formulaciones con menor grado de reemplazo de harina la tendencia fue hacia una disminución del tamaño, área ocupada y circularidad de los alvéolos, aunque las diferencias no fueron significativas en todos los casos.

Tabla 2. Parámetros de calidad evaluados a distintos tiempos de almacenamiento congelado

Formulación	HA0		HA15		HA25		HA35	
Almacenamiento (semanas)	0	12	0	12	0	12	0	12
Altura/peso (mm/g)	$0,7^{dB}$	$0,5^{A}$	$0,6^{cB}$	$0,5^{A}$	$0,5^{bA}$	$0,5^{A}$	$0,4^{aA}$	$0,4^{A}$
Area media alveolar (mm^2)	$1,5^{cB}$	$1,1^{A}$	$1,4^{cB}$	$1,0^{A}$	$1,1^{bA}$	$1,1^{A}$	$0,8^{aA}$	$0,8^{A}$
% Area ocupada por alveolos (-)	44^{cA}	38^{A}	41^{bB}	37^{A}	40^{bA}	40^{A}	38^{aA}	37^{A}
Circularidad (-)	$0,57^{bA}$	$0,55^{A}$	$0,58^{bB}$	$0,55^{A}$	$0,53^{aA}$	$0,53^{A}$	$0,52^{aA}$	$0,53^{A}$

Letras minúsculas indican diferencias entre formulaciones para dia 0; letras mayúsculas indican diferencias con el almacenamiento dentro de cada formulación

La humedad de miga fue mayor cuanto mayor fue el contenido de HA en la formulación y esto se debió a una mayor relación agua/contenido de sólidos para las formulaciones con mayor grado de reemplazo de harina. En estas se redujo el nivel de azúcar incorporado debido al elevado contenido de azúcares presente en la HA. Para las migas de los panes obtenidos con las masas congeladas no se registraron tendencias claras que indiquen un efecto del tratamiento sobre este parámetro. Los valores de humedad de miga registrados estuvieron entre 32,7-34,3; 34,1-35,5%; 35,3-36,7% y 37,1-38,3% para las formulaciones HA0, HA15, HA25 y HA35 respectivamente.

La dureza de la miga en los panificados se relaciona de forma inversa con el volumen específico o el grado de "aireación" de la miga. En los panes dulces obtenidos a partir de las masas frescas la dureza (Figura 4) se correlacionó de forma inversa con los valores ya discutidos para la relación altura/peso (la dureza fue mayor para las formulaciones con mayor grado de reemplazo de HT por HA). El almacenamiento congelado de masas para panificación puede generar principalmente dos problemas: la pérdida de viabilidad de levaduras y el daño de la matriz proteica de gluten, ambos discutidos en los apartados anteriores. Estos procesos pueden afectar las propiedades texturales de los productos obtenidos luego de la cocción: un menor nivel de levaduras viables conduce a una menor generación de gas durante la fermentación de la masa, mientras que el daño de la matriz de gluten genera una menor capacidad de expansión de la masa y retención del gas generado.

En los panes con menor contenido de HA (HA0 y HA25) se observó una tendencia de incremento significativo ($p < 0,05$) de dureza de miga con el tiempo de almacenamiento congelado de las masas. Por otro lado, esta tendencia no se observó en las formulaciones con mayor grado de reemplazo de harina (HA25 y HA35). Estas observaciones se condicen con el comportamiento de la relación altura/peso ya discutida y con las características microestructurales descriptas para las masas frescas y almacenadas con diferente contenido de HA. Las masas HA0 y HA15 fueron las que mayor deterioro mostraron con la congelación-almacenamiento congelado y coincide con una mayor pérdida de relación altura/peso y aumento de dureza de miga en los panes obtenidos.

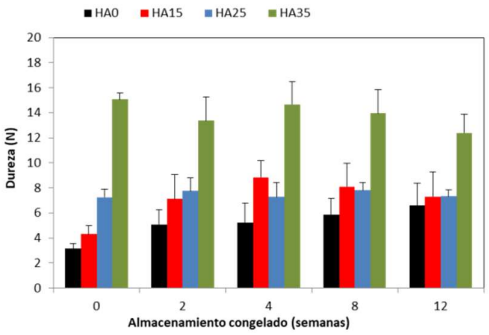


Figura 4. Efecto del tiempo de almacenamiento congelado de las masas sobre la dureza de miga de los panes obtenidos con ellas.

La cohesividad de miga se relaciona con la integridad de la misma, la capacidad de los componentes de mantenerse unidos. La cohesividad de miga de los panes obtenidos con masa fresca fue menor a medida que se incrementó el reemplazo de HT por HA (Figura 5). Este hecho se puede relacionar directamente con la estructura de la matriz de gluten, de mejor calidad en las formulaciones con mayor contenido de HA (Fig. 2E y G).

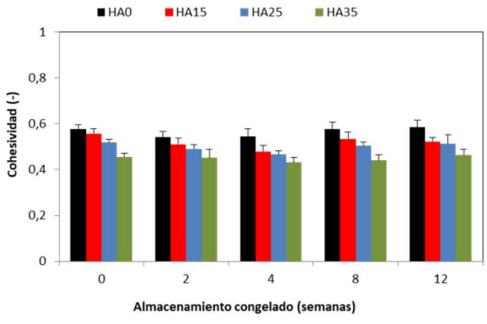


Figura 5. Efecto del tiempo de almacenamiento congelado de las masas sobre la cohesividad de miga de los panes obtenidos con ellas.

El deterioro de la matriz de gluten, por ejemplo por procesos como la congelación y/o almacenamiento congelado, ha sido descrito como uno de los causantes de pérdidas de cohesividad. A pesar de ciertas observaciones que indicarían deterioro de la matriz de gluten con el proceso congelación-almacenamiento congelado (especialmente en las formulaciones HA0 y HA15), para las 4 formulaciones ensayadas la cohesividad de miga no sufrió modificaciones significativas ($p > 0,05$) con la congelación y almacenamiento congelado.

4. Conclusiones

El factor determinante de las características de los panettone congelados y almacenados a bajas temperaturas fue su formulación. Respecto a la viabilidad de las levaduras, la mayor pérdida se registró por la congelación pero no hubo cambios significativos posteriores durante el almacenamiento. Aquellas formulaciones con mayor reemplazo de harina de trigo por harina de algarrobo (25 y 35%) evidenciaron menores cambios a nivel microestructural por formación de hielo probablemente por tener una red de gluten menos estructurada y organizada que los panes con menos reemplazo. Para estos panes, los cambios de texturales de la miga no fueron significativos después del período de almacenamiento respecto a las características del pan obtenido a partir de masa fresca. Los panes con menor reemplazo por harina de fruto de algarrobo se vieron más afectados en su volumen y dureza, lo que se pudo relacionar con cambios a nivel de microestructura de las masas. Estos resultados indican que las masas de panettone con alto contenido de harina de fruto de algarrobo pueden ser sometidas a congelación y almacenamiento congelado sin registrarse pérdidas de calidad significativas en el producto final.

5. Referencias

Baier-Schenk, A., Handschin, S., & Conde-Petit, B. (2005). Ice in prefermented frozen bread dough—an investigation based on calorimetry and microscopy. Cereal Chemistry, 82(3), 251-255.

Bárcenas, M. E., & Rosell, C. M. (2006). Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of par-baked bread. Food Chemistry, 95(3), 438-445.

Bigne, F., Ferrero, C., & Puppo, M. C. (2019). Effect of freezing and frozen storage on mesquite–wheat dough for panettone-like breads. Journal of Food Measurement and Characterization, 13(4), 2853-2861.

Bigne, F., Puppo, M. C., & Ferrero, C. (2018). Mesquite (Prosopis alba) flour as a novel ingredient for obtaining a “panettone-like” bread. Applicability of part-baking technology. LWT, 89, 666-673.

Codón, A. C., Rincón, A. M., Moreno-Mateos, M. A., Delgado-Jarana, J., Rey, M., Limón, C. & Benítez, T. (2003). New Saccharomyces cerevisiae baker's yeast displaying enhanced resistance to freezing. Journal of agricultural and food chemistry, 51(2), 483-491.

Correa, M. J., Ferrer, E., Añón, M. C., & Ferrero, C. (2014). Interaction of modified celluloses and pectins with gluten proteins. Food Hydrocolloids, 35, 91-99.

Esselink, E. F., van Aalst, H., Maliepaard, M., & van Duynhoven, J. P. (2003). Long-term storage effect in frozen dough by spectroscopy and microscopy. Cereal chemistry, 80(4), 396-403.

Luo, W., Sun, D. W., Zhu, Z., & Wang, Q. J. (2018). Improving freeze tolerance of yeast and dough properties for enhancing frozen dough quality-A review of effective methods. Trends in Food Science & Technology, 72, 25-33.

Meziani, S., Jasniewski, J., Gaiani, C., Ioannou, I., Muller, J. M., Ghoul, M., & Desobry, S. (2011). Effects of freezing treatments on viscoelastic and structural behavior of frozen sweet dough. Journal of Food Engineering, 107(3-4), 358-365.

Meziani, S., Jasniewski, J., Ribotta, P., Arab-Tehrany, E., Muller, J. M., Ghoul, M., & Desobry, S. (2012). Influence of yeast and frozen storage on rheological, structural and microbial quality of frozen sweet dough. Journal of Food Engineering, 109(3), 538-544.

Oda, Y., Uno, K., & Ohta, S. (1986). Selection of yeasts for breadmaking by the frozen-dough method. Applied and environmental microbiology, 52(4), 941-943.

Ozulku, G., & Arıcı, M. (2017). Characterization of the rheological and technological properties of the frozen sourdough bread with chickpea flour addition. Journal of Food Measurement and Characterization, 11(3), 1493-1500.

Ribotta, P. D., León, A. E., & Añón, M. C. (2003). Effects of yeast freezing in frozen dough. Cereal Chemistry, 80(4), 454-458.

Simmons, A. L., Smith, K. B., & Vodovotz, Y. (2012). Soy ingredients stabilize bread dough during frozen storage. Journal of Cereal Science, 56(2), 232-23.

10TCA - Maní Exportación: Monitoreo y control estadístico de cuerpos extraños en procesos de alta calidad.

Peanut for Export: Foreign bodies monitoring and statistical control in high quality processes

Silvia Simón[1], Miriam Ferrari[1], Mercedes Carnero[1].

1. UNRC. Ruta 8 km 601, Río Cuarto- Córdoba. ssimon@ing.unrc.edu.ar

Resumen

Durante la cosecha del maní, aparecen vinculados con el grano un conjunto de elementos no deseados denominados cuerpos extraños. Las plantas seleccionadoras de maní tratan de eliminar la mayor parte de las impurezas con el objetivo de cumplir con las especificaciones exigidas por el mercado consumidor. Los avances tecnológicos aplicados durante el procesamiento del maní para exportación han permitido reducir la cantidad de cuerpos extraños y en consecuencia aparece una alta proporción de ceros en la característica analizada. La implementación de un sistema de control estadístico en el proceso garantiza un producto con calidad aceptable en el tiempo. En el presente trabajo se desarrolla una metodología de análisis para la característica cuerpos extraños. Para ello, se utilizan datos que simulan situaciones reales de la industria manisera. Se investigan y analizan diferentes modelos probabilísticos clásicos y modelos innovadores como el binomial cero inflado (ZIB) o el Poisson cero inflado (ZIP). Se calculan los límites en la carta de control y se analiza la sensibilidad del gráfico. El estudio realizado permite comprobar que el modelo ZIB es un modelo robusto y el análisis de la sensibilidad medida en términos de longitud promedio de corrida (ARL) detecta rápidamente los cambios pequeños en los parámetros del proceso.

Palabras clave: maní, cuerpos extraños, ZIB, ARL

Abstract

During the peanut harvest, a set of unwanted elements called foreign bodies appear together to the grain. The peanut sorting factories try to eliminate most of the impurities in order to meet the specifications required by the consumer market. The technological advances applied during the processing of peanuts for export have made it possible to reduce the amount of foreign bodies and consequently a high proportion of zeros appears in the analyzed characteristic. The implementation of a statistical control system in the process guarantees a product with acceptable quality over time. In the present work, an analysis methodology for the foreign body characteristic is developed. For this, data that simulate real situations in the peanut industry, are used. Different classical probabilistic models and innovative models such as the inflated zero binomial (ZIB) or the inflated zero Poisson (ZIP) are investigated and analyzed. Limits are calculated on the control chart and the sensitivity of the chart is analyzed. The carried out study allows us to verify that the ZIB model is a robust model and the analysis of the sensitivity measured in terms of average run length (ARL) quickly detects small changes in the process parameters

Keywords: peanut, foreign bodies, ZIB, ARL

1. Introducción

La cadena agroindustrial del maní en la Argentina está situada fundamentalmente en el suroeste de Córdoba y reúne alrededor del 90% de la superficie total sembrada con maní (Fernández, 2017). Durante la cosecha del cereal, aparecen en forma conjunta con el grano de maní, un conjunto de atributos denominados cuerpos extraños. Las plantas seleccionadoras de maní eliminan la mayor parte de las impurezas para cumplir con las especificaciones exigidas por el mercado consumidor (Cámara Argentina del Maní, 2021).

La producción de maní confitería requiere diversas operaciones de limpieza y separación como se puede observar en la figura 1. La inspección por muestreo es un procedimiento habitual en las empresas maniseras ya que se trata de un proceso con altos volúmenes de producción. La cantidad de cuerpos extraños (CE) es una característica de calidad muy controlada en la etapa final del proceso. No obstante, existe poca información sobre la problemática de los cuerpos extraños en la literatura abierta.

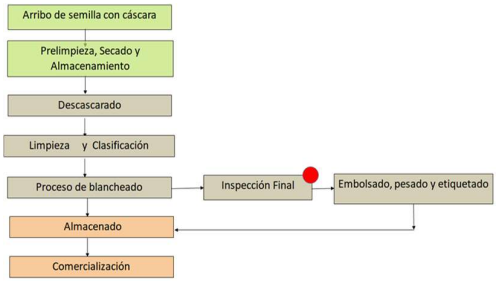


Figura 1. Etapas principales en el proceso de obtención de maní confitería

El control estadístico de procesos (SPC) es la aplicación de técnicas para determinar si el resultado de un proceso concuerda con el diseño del producto correspondiente (Montgomery, 2009), (Gutiérrez Pulido, 2010). Un proceso está bajo control cuando se puede predecir su comportamiento en el tiempo. Para monitorear y controlar determinadas características o atributos de calidad de un proceso se realizan las cartas de control. Un gráfico de control es una representación gráfica de una característica de calidad medida a partir de una muestra y repitiendo este muestro en el tiempo. La línea central representa el valor medio de la característica en estado de control. Los límites de control superior e inferior se determinan como el valor medio de la característica más/menos k desvíos de manera que cuando el proceso está bajo control se espera que la mayor parte de los valores muestrales graficados se ubiquen entre los límites. Si esto no sucede, el proceso está fuera de control y serán necesarias acciones de investigación y corrección. (Xie *et al.,* 2002).

El SPC basado en las cartas de control implica el conocimiento del modelo probabilístico de distribución asociado a la característica de calidad estudiada y sus parámetros. Los modelos de distribución binomial y Poisson son ampliamente utilizados para describir defectos o unidades no conformes (ecuaciones 1 y 2).

$$f(x,n,p) = \binom{n}{x} p^x (1-p)^{n-x}, \quad x = 0,1,2,3,\dots,n \tag{1}$$

$$f(x,\lambda) = \frac{e^{-\lambda}\lambda^x}{x!}, \quad x = 0,1,2,3,\dots \tag{2}$$

Si el modelo de distribución utilizado no proporciona un buen ajuste a los datos reales, los límites de la carta de control no serán los adecuados y frecuentes señales de falsa alarma serán detectadas.

El procedimiento de estimación de los parámetros más ampliamente utilizado, es el método máximo verosímil.

Se define la función de verosimilitud (ecuación 3) que permite evaluar la probabilidad de observar los valores muestrales y_1,.....,y_m, como una función del parámetro. El valor que da la máxima probabilidad de observar los valores de la muestra es el parámetro estimado (Montgomery, 2003).

$$L(\phi) = \prod_{i=1}^{m} f(y_i, \phi) \tag{3}$$

La bondad del ajuste se verifica empleando el criterio de Akaike (ecuación 4). Mientras más pequeño es el valor de Akaike mejor es el ajuste (Akaike, 1974).

$$AIC = 2[-L(\hat{\phi}) + d] \tag{4}$$

Con la carta de control adecuada, se realiza el análisis de sensibilidad mediante el cálculo de la longitud promedio de corrida (ARL) que se define como el número de puntos que en promedio se deben graficar en la carta para que ésta detecte una señal fuera de control y que permite detectar causas asignables en tiempos apropiados. El ARL se obtiene como $1/p$ donde p es la probabilidad de que cualquiera de los puntos exceda los límites de control. Cuando el proceso está bajo control, *in control (IC)* (Alevizakos & Koukouvinos, 2020), la longitud promedio de corrida se conoce como ARL_0 y se define como $1/\alpha$. El valor k de los límites de control se determina fijando una probabilidad de error de tipo I (α) de 0.0027. Esto implica que una falsa alarma se produce en 1 de cada 370 puntos muestrales. Si el proceso está fuera de control, *out of control* (OOC) (Alevizakos & Koukouvinos, 2020), el ARL se conoce como $ARL_1=1/(1-\beta)$, siendo β el error de tipo II. Este valor indica verdaderas alarmas y se

pretende que sea pequeño para detectar rápido un punto fuera de control (Montgomery, 2009).

Las exigencias de calidad e inocuidad se han incrementado a nivel mundial y en consecuencia la industria manisera ha implementado tecnologías de procesamiento para reducir la cantidad de cuerpos extraños a valores muy pequeños lo que implica una alta proporción de ceros en la característica analizada. En los procesos de alta calidad la tasa de defectos es muy baja y por lo tanto el atributo analizado asume en la mayoría de los casos valor cero. Esto puede dar como resultado una estimación sesgada de los parámetros de los modelos antes mencionados y una subestimación de la dispersión de los datos. Como consecuencia los límites de control estimados resultan más estrechos y aumenta la probabilidad de falsas alarmas. Varios investigadores han propuesto modelos que contemplan la situación de datos inflados de ceros, entre ellos se encuentran los modelos *zero-inflated Poisson* (ZIP) y *zero-inflated binomial* (ZIB), los cuales se obtienen combinando adecuadamente el modelo tradicional con una singular distribución de ceros (Mahmood, 2019). Estos modelos permiten discriminar unidades conformes (cero cuerpos extraños) de aquellas cuyo contenido de cuerpos extraños puede ser modelado con la distribución clásica (ecuaciones 5 y 6).

$$f(x,\varphi,n,p)=\begin{cases}\varphi \;+\; (1-\varphi)(1-p)^n, & x=0\\ (1-\varphi)\binom{n}{x}p^x(1-p)^{n-x}, & x=1,2,3,..,n\end{cases} \tag{5}$$

$$f(x,\varphi,\lambda)=\begin{cases}\varphi \;+\; (1-\varphi)e^{-\lambda}, & x=0\\ (1-\varphi)\frac{e^{-\lambda}\lambda^x}{x!}\;, & x=1,2,3,\dots,n\end{cases} \tag{6}$$

Las distribuciones cero inflado se utilizan para el cálculo de los límites de control. Los límites de control pueden fijarse bien lejanos a la línea central y en este caso se corre el riesgo de tomar la decisión de que el proceso está bajo control cuando en realidad no lo está (error tipo II en la prueba de hipótesis). O bien cercanos a la línea central, en cuyo caso se puede cometer el error tipo I de decidir que el proceso está fuera de control cuando en realidad está controlado.
Por lo antes expuesto, en el presente trabajo se investigaron y analizaron diferentes modelos probabilísticos para describir el comportamiento de la variable cuerpos extraños en procesos de alta calidad. Se calcularon los límites en las cartas de control y se realizó un análisis de sensibilidad para las distintas situaciones estudiadas.

2. Materiales y métodos

En el presente trabajo se tomaron como datos de estudio los valores de la variable CE en maní confitería publicados por Whitaker (2008).
En dicho trabajo, el procedimiento de muestreo fue realizado en la etapa correspondiente a la inspección final antes de ser embolsado. Seis lotes de maní pelado tipo runner calibre 40/50 fueron examinados aplicando un plan de muestreo de 88 muestras en promedio para cada lote, de 9 kg cada una y se registraron los CE de cada muestra del total analizado (502 muestras). El número de granos en la muestra de 9 kg (n) no fue contado, pero se estimó multiplicando la masa de la muestra por la media por unidad de masa (estandarizado industrialmente como 1586 granos por kg (45 onzas) para el maní pelado medio). Se asumió que en las muestras solo hay granos de maní y cuerpos extraños de características similares al grano de maní. Para el monitoreo y control estadístico se utilizaron cuatro muestras obtenidas al modificar los valores del recuento de cuerpos extraños en lotes de maní pelado publicados por Whitaker (2008) y que replican situaciones posibles en la industria manisera.
Se realizó un análisis estadístico descriptivo de la característica de calidad cuerpos extraños para individualizar los estadísticos más relevantes. A los efectos de obtener un modelo estadístico predictivo del comportamiento de los cuerpos extraños se ajustaron los valores muestrales con los siguientes modelos de distribución de probabilidad. En el modelo binomial clásico (ecuación 1), la variable aleatoria X indicó el número de unidades no conformes o cantidad de cuerpos extraños en una muestra con 14274 unidades. El parámetro de proceso p representó la proporción de CE en la muestra de 14274 unidades. En el modelo Poisson clásico (ecuación 2) la variable aleatoria X determinó cuantos CE se encontraron en una muestra de 9 kg. El parámetro λ indicó en promedio la cantidad de CE en 9 kg. Los modelos binomial cero inflado (ecuación 5) y Poisson cero inflado (ecuación 6) permitieron discriminar unidades conformes (cero CE) de aquellas cuyo contenido de CE pudo ser modelado con las distribuciones clásicas binomial o Poisson. El parámetro φ del modelo cero inflado, relacionado con unidades conformes, asumió valores entre 0 y 1.
Los parámetros de los modelos fueron estimados mediante el método máximo verosímil utilizando herramientas de cómputo numérico.
La bondad del ajuste se verificó empleando el criterio de Akaike.
Se estimaron los límites de las cartas de control propuestas y el ARL para cada una de ellas.
Una de las cartas de control por atributos que se utilizó fue la carta *np* para el número de unidades no conformes en la muestra de 14274 granos. Para

la construcción de la carta *c,* se consideró como unidad la muestra 9 kg o 14274 granos y se contaron la cantidad de CE en dicha unidad.

3. Resultados y Discusión

3.1. Análisis de modelos de distribución de probabilidad para procesos IC

Los valores reportados para el proceso IC son los que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de frecuencias muestra IC

CE	Frecuencia absoluta
0	480
1	8
2	14

Los parámetros para los distintos modelos probabilísticos analizados fueron estimados implementando rutinas de cálculo numérico. Todos los procedimientos fueron ejecutados utilizando un procesador Intel ® Core (TM) i7 CPU 920 @ 2.67 GHz, 6GB RAM, usando MatLab Release 14.
La bondad del ajuste se determinó aplicando el criterio AIC. En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 2. Parámetros poblacionales y criterio AIC

Media Muestral= 0.072 Varianza muestral= 0.12

Modelo	AIC	$(1-\varphi)$	p	E(X)	Var(X)
Binomial	283.14	-----	5.024e-06	0.072	0.072
ZIB	227.76	0.066	7.6e-05	0.072	0.144

Modelo	AIC	$(1-\varphi)$	λ	E(X) Var(X)
Poisson	283.13	-----	0.072	0.072 0.072
ZIP	227.77	0.066	1.0845	0.072 0.144

A los efectos de determinar si el proceso corresponde a modelos clásicos como binomial y Poisson con un número elevado de ceros o si se está en presencia de una cantidad de ceros que es superior a la esperada para una distribución binomial o Poisson estándar, se contrastó con los modelos innovadores ZIB y ZIP sugeridos en la literatura consultada para procesos industriales de alta calidad. Los resultados de la tabla 2 indican que el modelo ZIB y el ZIP son adecuados para estos datos.

Tabla 3. Distribución de frecuencia relativa muestra IC

x_i	Frecuencia relativa	Binomial	ZIB
0	0.96	0.93	0.96
1	0.016	0.067	0.024
2	0.028	0.0024	0.013

En la tabla 3 se observan los valores de la distribución de probabilidades y la frecuencia relativa muestral. El modelo ZIB puede seguir a la distribución observada de manera más ajustada que el modelo binomial. En situaciones prácticas cuando el modelo binomial se utiliza para modelar datos con sobredispersión (mayor variabilidad de la que predice el modelo), se tiende a subestimar la variabilidad de los mismos y esta situación incrementa las señales de falsa alarma. El ejemplo que se está considerando es un caso evidente de datos con sobredispersión por exceso de ceros. El cálculo del promedio y varianza para cada uno de los modelos considerados se muestra en la Tabla 2.
En el presente trabajo se seleccionó el modelo ZIB para calcular el límite de control superior (UCL) ya que el límite inferior en procesos de alta calidad se asume igual a cero. Para la muestra estudiada, el límite superior de control es calculado con el modelo ZIB es de 3 mientras que el modelo binomial clásico predice un valor de 1, considerando una tasa de falsa alarma de 0,0027. La tabla 4 muestra claras evidencias de cómo afecta la elección del modelo en el cálculo del UCL y ARL_0.

Tabla 4. Límite de control superior. Longitud promedio de corrida

Modelo	ARL0	UCL
Binomial	14.45	1
ZIB	166.02	3

Las figuras 2 y 3 corresponden a los gráficos de control con límites de probabilidad calculados bajo el comportamiento binomial y ZIB respectivamente. Puede observarse la importancia de la selección de un modelo apropiado para evitar elevadas frecuencias de falsas alarmas con todo el impacto que ocasiona en el desarrollo del proceso.

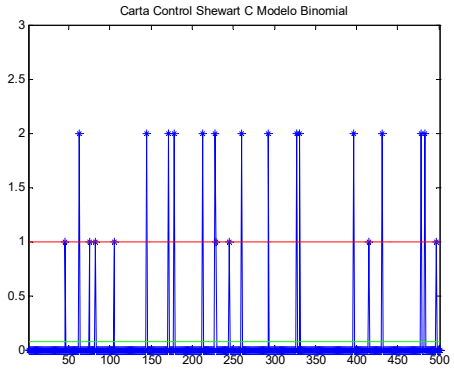


Figura 2. Carta de Control del proceso IC, bajo un modelo binomial

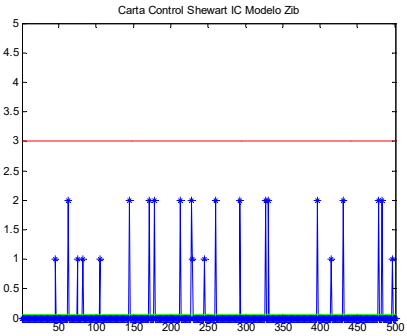


Figura 3. Carta de Control del proceso IC, bajo un modelo ZIB

3.2. Análisis de sensibilidad

Para estudiar la sensibilidad del gráfico de control basado en el modelo ZIB, se utilizó una muestra (tabla 5) que refleja una situación del proceso fuera de control (OOC) indicando que alguno o ambos parámetros del modelo se modificaron provocando un impacto en la señal de alarma (ARL_1). Para ello se calculó la longitud promedio de corrida, ARL_1. El ARL_1 se obtuvo mediante la relación 1/(1-β), es decir, la inversa de la potencia estadística de la prueba siendo β una medida de la habilidad del gráfico de control para detectar desplazamientos en los parámetros del proceso.

Tabla 5. Distribución de frecuencias muestra OOC

CE	Frecuencia absoluta
0	476
1	20
2	1
3	1
4	1
5	1
6	0
7	2

Para la muestra OOC, se estimaron los parámetros poblacionales para el modelo ZIB y se calculó el ARL_1. A los efectos de comparar las bondades del modelo de alta calidad, se estimó el ARL_1 bajo el supuesto de un modelo binomial.

Tabla 6. Parámetros poblacionales muestra IC y OOC.

Modelo	$(1-\varphi)$	p	E(X)	Var(X)
ZIB IC	0.066	7.6e-05	0.072	0.144
ZIB OOC	0.069	9.7e-05	0.096	0.219

Tabla 7. Análisis de sensibilidad.

Modelo	ARL0	ARL1	UCL
Binomial	14.46	10.97	1
ZIB	166.06	89.03	3

Pueden observarse diferencias significativas en la rapidez para detectar pequeños corrimientos de los parámetros del proceso. Considerando que las falsas alarmas se presentarán aproximadamente cada 166 muestras (tabla 7), la aparición de una alarma antes o después de ese valor indica un corrimiento de los parámetros del proceso (tabla 6). Para la muestra estudiada este comportamiento se produce luego de 89 muestras indicando la existencia de una causa asignable que empeoró el proceso (figura 4).

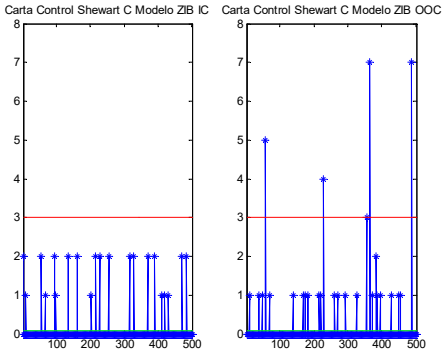


Figura 4. Carta de Control del proceso IC y OOC, bajo un modelo ZIB

La figura 5 muestra el impacto sobre la sensibilidad de la carta debida a una estimación errónea de los límites de control. El modelo de distribución utilizado no proporciona un buen ajuste a los datos reales y por lo tanto se observan frecuentes señales de falsas y verdaderas alarmas.

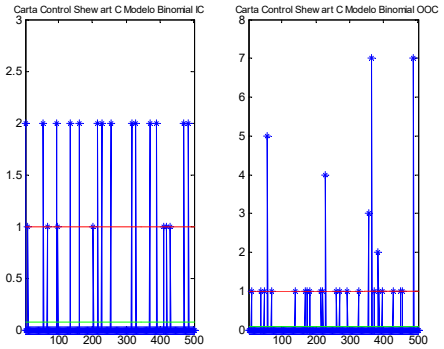


Figura 5. Carta de Control del proceso IC y OOC, bajo un modelo Binomial

Tabla 8. Análisis de sensibilidad. ARL1 para UCL=3

P / Φ	3,00E-06	1,27E-05	2,24E-05	3,21E-05	4,18E-05	5,15E-05	6,12E-05	7,09E-05	8,06E-05	9,03E-05	0,0001
0,03	81710	1196	242	92	46	28	18	13	10	7	6
0,13	91147	1334	270	102	52	31	20	14	11	8	7
0,23	103047	1508	305	116	58	35	22	17	12	9	8
0,33	118522	1734	351	133	67	39	26	18	14	11	9
0,43	139467	2041	413	156	79	47	31	22	16	13	10
0,53	169402	2479	502	190	96	57	37	27	21	15	13
0,63	215699	3157	639	242	122	73	48	35	26	20	16
0,73	296820	4344	880	333	168	100	65	48	35	27	22
0,83	475735	6963	1411	534	269	160	107	77	55	46	38
0,93	1197639	17529	3552	1343	678	404	269	185	147	117	96

La tabla 8 muestra cambios relativamente sensibles a aumentos en el valor de φ manteniendo p fijo. Esto es importante en el control estadístico de procesos dado que φ está relacionado con la presencia de unidades conformes. Cuando φ aumenta, hay más unidades sin defectos, y luego la cantidad de unidades que deben ser inspeccionadas antes que se dé una señal de alarma aumenta rápidamente. Por otro lado, a medida que la fracción de no conformes p aumenta, alejándose del valor de la hipótesis nula, manteniendo φ constante, aumenta la potencia y disminuye la cantidad de muestras a ser inspeccionadas antes de dar la alarma.

3.3. Robustez del modelo ZIB

La robustez del modelo se analiza probando los datos de conteo publicados por Whitaker (2008). Los resultados de literatura indicaron que las varianzas calculadas en las 88 muestras de cada lote son muy similares a las predichas por la distribución binomial.

Tabla 9. Datos de Whitaker

CE	Frecuencia absoluta
0	481
1	20
2	1

Tabla 10. Parámetros poblacionales y bondad de ajuste muestra Whitaker

Media muestral= 0.044 Varianza muestral= 0.046

Modelo	AIC	$(1-\varphi)$	p	E(X)	Var(X)
Binomial	185.00	-----	3.0702e-06	0.044	0.044
ZIB	186.53	0.4534	6.8e-06	0.044	0.046

La tabla 10 muestra que ambos modelos son apropiados y ajustan con la misma precisión. La figura 6 corrobora el ajuste. Se complementa el estudio aplicando ambos modelos a bases de datos confeccionadas a partir de la muestra original con modificaciones en la cantidad de ceros y pulsos de cuerpos extraños. En todos los casos se verifica que el modelo ZIB presenta un ajuste adecuado independientemente si lo datos provienen de un proceso de alta calidad o no, en tanto que para el modelo binomial el criterio de Akaike evidencia que en procesos de alta calidad el ajuste no es adecuado. Se presentan en tabla 11 y figura 7 los resultados obtenidos con una de las muestras simuladas.

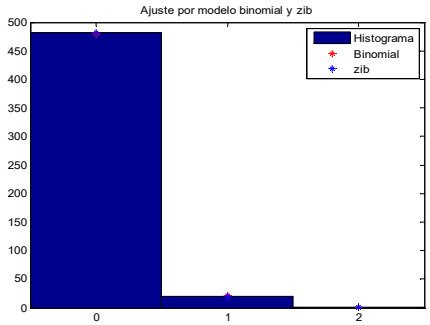


Figura 6. Histograma y ajustes para la muestra de Whitaker

Tabla 11. Parámetros poblacionales y bondad de ajuste muestra modificada

Modelo	AIC	$(1-\varphi)$	p
Binomial	648.07	-----	1.5e-05
ZIB	523.47	0.1605	9.6e-05

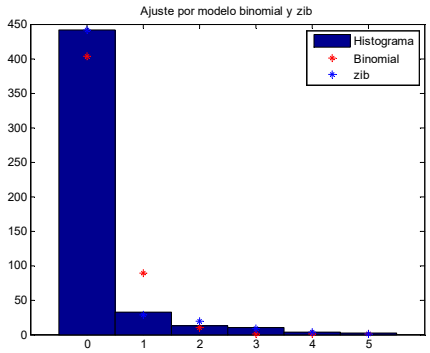


Figura 7. Histograma y ajustes para muestra modificada

Respecto al cálculo de la longitud promedio de corrida los resultados mostrados en tabla 12 confirman la robustez del método. Tanto el límite de control superior como el ARL_0 en ambos modelos coincide.

Tabla 11. Límite de control superior y ARL_0 para ambos modelos

Modelo	ARL0	UCL
Binomial	23.32	1
ZIB	23.94	1

4. Conclusiones

El estudio realizado permitió comprobar que el modelo ZIB es un modelo robusto que capta las características particulares de procesos de alta calidad, esto es con gran cantidad de unidades conformes, así como de aquellos procesos que pueden ser estudiados o modelados con una distribución binomial clásica. Por otra parte, el análisis de la sensibilidad de las cartas de control construidas con un modelo ZIB, arrojó que la longitud promedio de corrida para detectar cambios pequeños en los parámetros del proceso es significativamente menor que cuando se emplean modelos clásicos.

5. Referencias

Akaike, H.,(1974) A New Look at the Statistical Model Identification. IEEE Transactions on Automatic Control, vol. AC-19,Nº6.

Cámara Argentina del Maní (2021) https://www.camaradelmani.org.ar

Fernandez E., Giayetto O., Cerioni G. & Morla F. (2017) El cultivo del maní en Córdoba. En: Fernandez E. & Giayetto O. (Compiladores), 2a Edición UNRC, Río Cuarto, Capítulo 18.

Gutiérrez Pulido, H. (2010), *Calidad Total y Productivida*d, 3° ed., Mc Graw Hill.

Mahmood T. and Xie M. (2019) *Models and monitoring of zero-inflated processes: The past and current trends*. Qual Reliab Engng Int.1–18 John Wiley and Sons.

Montgomery, D.C. (2003). Applied *Statistics and probability for engineers* , 34d ed., 13. John Wiley & Son.

Montgomery, D.C. (2009). *Introduction to Statistical Quality Control*, 6ª ed., 13. John Wiley & Son.

Vasileios Alevizakos and Christos Koukouvinos (2020) *Monitoring of zero-inflated binomial processes with a DEWMA control chart*. Journal of Applied Statistics.

Whitaker T.B., Slate A.B., and Giesbrecht F.G,(2008) *Designing Sampling Plans to Detect Foreign Material in Bulk Lots of Shelled Peanut.* Peanut Science 35: 159-164.

Xie M., Goh TN., Kuralmani V. (2002) *Statistical Models and Control Charts for High-Quality Processes.* Kluwer Academic Publishers.

Xie M., Goh TN., (1993) *SPC of near zero-defect process subject to random shock.* Quality ans Realiability Engineering International, vol.9, 89-93

Xie M., He B., Goh TN. (2001) *Zero-inflated Poisson model in statistical process control*. Computational Statistics & Data Analysys.

11TCA - Bacterias lácticas nativas de interés industrial aisladas a partir de arándanos frescos (*Vaccinium corymbosum*)

Native lactic acid bacteria of industrial interest isolated from fresh blueberries (*Vaccinium corymbosum*)

Ortiz Silvia Graciela[1], Tunez, Juan Ignacio[2], Gallo, Alicia[1], Raffellini, Silvia[1].

1. Universidad Nacional de Luján, Departamento de Tecnología, Argentina. ortizs@mail.unlu.edu.ar
2. Universidad Nacional de Luján. Departamento de Ciencias Básicas, INEDES-UNLu-CONICET, Argentina.

Resumen

Las bacterias lácticas pueden poseer propiedades funcionales de interés para elaboración de alimentos frutales innovadores. El objetivo de este trabajo fue aislar cepas nativas de bacterias lácticas con propiedades de interés industrial, a partir de arándanos frescos. Las cepas se aislaron en MRS agar, se sometieron a identificación preliminar y se determinó: actividad antagónica frente a microorganismos indicadores patógenos e indicadores; resistencia a pH 3; crecimiento ante diferentes temperaturas, sales biliares (1 %) y alta concentración de cloruro de sodio (6,5 %); producción de exopolisacáridos (EPS) y caracterización de metabolitos antimicrobianos extracelulares. Se aislaron 10 cepas caracterizadas preliminarmente como bacterias lácticas, de las cuales la cepa Ar2, identificada por métodos moleculares como perteneciente a la especie *Weissella confusa*, fue la que presentó mayor actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis. Además, resistió pH 3, creció en medio MRS adicionado con sales biliares (1%), produjo EPS y metabolitos extracelulares tipo bacteriocina con efecto anti-*Listeria monocytogenes*. Por consiguiente, la cepa nativa *Weissella confusa* Ar2 podría ser potencialmente aplicada en elaboración de alimentos frutales innovadores ya sea como cultivo bioprotector, probiótico o productor de espesantes naturales.

Palabras clave: Bacterias lácticas, frutas, bioprotección, probióticos, exopolisacáridos

Abstract

Lactic acid bacteria may have functional properties that can be used for the production of innovative fruit foods. The objective of this work was to isolate native strains of lactic acid bacteria with properties of industrial interest from fresh blueberries. Native strains were isolated on MRS agar and subjected to preliminary identification. Antagonistic activity against pathogenic and indicator microorganisms was determined. Other tests carried out were: resistance to pH 3; growth at different temperatures, bile salts (1%) and high concentration of sodium chloride (6.5%); production of exopolysaccharides (EPS); and characterization of extracellular antimicrobial metabolites. Ten native strains preliminarily characterized as lactic acid bacteria were isolated. The Ar2 strain, identified by molecular methods as *Weissella confusa*, showed the highest inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and Salmonella Enteritidis. In addition, it resisted pH 3, grew in MRS medium added with bile salts (1%), produced EPS and extracellular bacteriocin-like metabolites with anti-Listeria monocytogenes effect. Consequently, the native lactic strain *Weissella confusa* Ar2 could potentially be applied in the production of innovative fruit foods either as a bioprotective microorganism, as a producer of natural thickeners or as a probiotic culture.

Keywords: Lactic acid bacteria, fruit, bioprotection, probiotics, exopolysaccharides

1. Introducción

En la actualidad, se percibe por parte de los consumidores un marcado interés por la adopción de dietas saludables, poco procesadas, y con menos aditivos químicos, por lo que la industria alimentaria necesita buscar alternativas que permitan ofrecer alimentos seguros, pero al mismo tiempo de alta calidad nutritiva y organoléptica. Las sociedades desarrolladas registran un incremento de la población que, por diferentes causas como intolerancia a la lactosa, alergia a las proteínas de la leche, alto contenido de colesterol o de ácidos grasos saturados, han optado por consumir dietas vegetarianas o veganas (Vijaya Kumar *et al.*, 2015). Las frutas y las hortalizas son esenciales para una dieta equilibrada debido a su contenido de agua, vitamina, minerales; carbohidratos (glucosa y fructosa), fibra, y compuestos bioactivos tales como polifenoles, carotenoides, tocoferoles entre otros, los cuales poseen efectos beneficios comprobados para la salud (Rodriguez *et al*., 2015; Ayed *et al*., 2020). Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la ingesta de un mínimo de 400 g diarios de frutas y verduras, para prevenir enfermedades crónicas y mitigar varias carencias de micronutrientes (OMS, 2018).

Las frutas pueden ser consumidas frescas, en jugos o néctares, en ensaladas o en variedad de frutas IV GAMA, lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y envasadas, sin embargo, la vida útil de estos alimentos es corta y son susceptibles al deterioro microbiano por su alto contenido de nutrientes y actividad de agua (Rodriguez *et al*., 2015; Valero, 2018). Asimismo, han estado también involucradas en brotes de enfermedades de trasmitidas por alimento (ETA), producidos por distintos microorganismos como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, y diferentes serovariedades de *Salmonella enterica* o de *Escherichia coli* (Oliveira *et al.*, 2018; Carstens *et al.*, 2019; EFSA and ECDC, 2021).

Una alternativa para la conservación de estos alimentos es la biopreservación (Ananou *et al.*, 2007), que consiste en la aplicación de microorganismos, como por ejemplo bacterias lácticas (BAL), y/o sus metabolitos para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes (O´Sullivan *et al*., 2002; Akbar *et al.*, 2016). Las BAL pueden contribuir también al desarrollo de características organolépticas, reológicas y de textura en alimentos innovadores de matriz vegetal debido a la habilidad de algunas cepas de producir exopolisacáridos (EPS) *in situ* que actúen como bioespesantes naturales. La producción de EPS por BAL está recibiendo creciente atención en los últimos años debido a los posibles efectos benéficos para la salud, en particular la actividad anticancerígena, antitumoral e inmunomoduladora (Behare *et al.,* 2009; Patel *et al*., 2014). Estos efectos se suman a los ya demostrados en algunas cepas de BAL como por ejemplo la contribución al mantenimiento del equilibrio de la población microbiana en el tracto gastrointestinal o el aumento de la respuesta inmune contra infecciones entre otros, por lo que se las considera bacterias probióticas (Vinderola y Reinheimer, 2003; Fontana *et al*., 2013).

En general la población de bacterias lácticas en frutas y hortalizas se encuentra en un rango de 10^2 y 10^4 UFC/g y, hasta la fecha, la diversidad de bacterias lácticas en frutas ha sido escasamente estudiada, siendo los géneros frecuentemente reportados *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Weissella y Enterococcus* (Di Cagno *et al*., 2010; Emerenini *et al* 2013; Ruiz Rodríguez *et al*., 2019, Bouzaiene *et al*., 2019; Linares Morales *et al*., 2020).

Por otra parte, las frutas constituyen posibles sustratos para la inclusión de microorganismos probióticos, cuyos efectos benéficos se sumarían a las ventajas funcionales que ya de por sí presentan estos alimentos (fuente de micronutrientes, bajo contenido de alérgenos, buena digestibilidad). Además, esta inclusión podría ser una alternativa para aumentar el bajo consumo de vegetales frescos que se observa en países en desarrollo (Bernal Castro *et al.*, 2017).

La combinación de cepas de bacterias lácticas productoras de EPS, de metabolitos antimicrobianos naturales con actividad biológica y con características probióticas, suponen una alternativa a los métodos tradicionales, para la conservación de los parámetros de calidad de alimentos de matriz vegetal, sumado los efectos benéficos que ejercen a la salud. Por consiguiente, el objetivo del siguiente trabajo fue aislar cepas de bacterias lácticas con propiedades de interés industrial a partir de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) frescos, que puedan ser empleadas en la elaboración de alimentos innovadores derivados de frutales.

2. Materiales y métodos

-Procesamiento de las frutas, aislamiento de bacterias lácticas y conservación de las cepas lácticas

Para el aislamiento de bacterias lácticas a partir de arándanos frescos adquiridos en supermercados, se preparó un homogenato en bolsas plásticas

estériles (Whirl-Pack Nasco, EEUU) para lo cual se pesó 20 g del material, se agregó 180 ml de agua peptonada (0,1 %), y posteriormente se homogeneizó en digestor tipo Stomacher (Lab Cima, Argentina) durante 30 segundos a velocidad media. A partir de los homogenatos se realizaron placas de aislamiento en agar MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) mediante siembra en superficie por agotamiento. Las placas se incubaron 48 h a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, al cabo de las cuales se aislaron con pipeta Pasteur las colonias que presentaron morfología típica de bacterias lácticas. Las cepas de bacterias lácticas aisladas se conservaron a – 20 °C en caldo MRS adicionado con 15 % de glicerol. Antes de ser empleadas en los ensayos correspondientes, las cepas se inocularon en caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

-Cepas empleadas como indicadoras de actividad antibacteriana

Las cepas bacterianas empleadas como indicadoras de la actividad antibacteriana en los diferentes ensayos fueron: *Bacillus cereus* MA 130, *Cronobacter sakazakii* MA13, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O:157 MA 61, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2583, *Salmonella* Enteritidis MA 44 y *Staphylococcus aureus* MA 106, provistas por la colección de cultivos del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional de Luján; *Listeria innocua* CIP 8011, provista por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA; y *Listeria monocytogenes* tipo 1 BE 16/96, *Listeria seeligeri* 19/02, *Listeria welshimeri* BE313/01, provistas por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Las cepas de bacterias se conservaron a – 20 °C en caldo triptona soja (TSB, Biokar, Francia) adicionado con 15 % de glicerina. Antes de ser empleadas en los ensayos las cepas se desarrollaron en TSB y agar triptona soja (TSA, Biokar, Francia) 24 h a 37 °C.

- Identificación taxonómica preliminar de las cepas lácticas aisladas

Para la identificación taxonómica preliminar las cepas aisladas se sometieron a las siguientes pruebas: tinción de Gram, catalasa, fermentación de azúcares, diferenciación entre homofermentativas y heterofermentativas.

- Caracterización de las cepas lácticas aisladas

Desarrollo a 15, 30, 37 y 45 ºC

A partir de cultivos ON, cada una de las cepas se inoculó en caldo MRS y se incubó a 15, 30, 37 y 45 ºC durante 24-48 h, al cabo de las cuales se observó en forma cualitativa el desarrollo de turbidez. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Desarrollo en ClNa al 6,5 %

A partir de cultivos ON, cada una de las cepas se inoculó en caldo MRS adicionado con 6,5 % de ClNa y se incubaron a 37 ºC durante 24-48 h al cabo de las cuales se realizó la lectura cualitativa de la turbidez producida. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Producción de exopolisacáridos (EPS)

La producción de EPS se determinó sembrando cada cepa, con ansa calibrada (10 µl), en MRS agar suplementado con 5 % de sacarosa (Grosur-Tudor y Zamfir 2011). Las placas se incubaron a 37 ºC durante 24-48 h al cabo de las cuales se observó el desarrollo de colonias mucosas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resistencia a sales biliares

La resistencia a la bilis se determinó mediante el método modificado propuesto por Kociubinski *et al*. (1999). A partir de cultivos ON, las cepas de bacterias lácticas se sembraron con ansa calibrada (10 µl) en placas de agar MRS adicionado con 1 % de sales biliares (Britania, Argentina) y se incubaron 24 h a 37 ºC. Para control, las cepas se sembraron también en medio MRS sin adición de sales biliares. Finalizada la incubación se comparó cualitativamente el desarrollo de las cepas en medios con y sin sales biliares adicionadas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resistencia a pH ácidos (pH 3)

La resistencia a pH 3 de las cepas de bacterias lácticas, se evaluó mediante el método propuesto por Garriga *et al.* (1998) modificado. A partir de cultivos ON cada una de las cepas se sembraron en tubos de centrífuga con 10 ml de caldo MRS y se incubaron 24 horas; a continuación, se recuperaron las células por centrifugación (5000 rpm, 10 minutos, 4 ºC), los pellets fueron lavados 2 veces en buffer fosfato salino pH 6,5 (PBS 6,5) y resuspendidos en 10 ml de PBS. De cada cepa se colocó 0,5 ml de suspensión en tubos con 4,5 ml de PBS con pH 3 (pH ajustado con HCl 1 M) y pH 6,5, utilizado como control, que se incubaron 3 horas a 37 ºC. Se realizó el recuento de bacterias lácticas por siembra en profundidad en placas con MRS agar al inicio y al final de la exposición. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h; a partir del recuento de unidades formadoras de colonias (ufc), se calculó el Índice de Supervivencia (IS) de la población expuesta a pH 3 utilizando la fórmula 1:

$$IS = \text{Log ufc final} / \text{Log ufc inicial} \quad (1)$$

Donde IS es el índice de supervivencia después de la exposición a pH 3 durante 3 horas; Log ufc

final es el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias de la población después de haber sido expuesta durante 3 horas a pH 3, y Log ufc inicial es el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias de la población al inicio de la exposición.

-Determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* de las cepas lácticas aisladas sobre bacterias indicadoras

Para determinar la capacidad inhibitoria de las cepas de bacterias lácticas se utilizó la técnica de estrías cruzadas (González *et al.*, 1995). Las cepas lácticas se sembraron en un arco de las placas de Petri sobre agar MRS y se incubaron 24 h a 37 °C. Posteriormente, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Salmonella* Enteritidis MA 44, se sembraron en forma de estría perpendicular al cultivo desarrollado de la cepa láctica y las placas se incubaron a 37 °C. Las longitudes de las zonas de inhibición se midieron con calibre (en mm) cada 24 h durante 120 h. Los ensayos se realizaron por triplicado.

-Determinación de la producción de metabolitos antimicrobianos extracelulares

Esta determinación se realizó con el extracto libre de células (ELC) del cultivo de la cepa láctica que presentó la mayor actividad inhibitoria sobre bacterias indicadoras en el ensayo de estrías cruzadas. Para la obtención del ELC, la cepa se cultivó 3 veces consecutivas en caldo MRS y se incubó ON a 37 °C. El cultivo obtenido se sembró al 3% en 100 ml de caldo MRS, se incubó a 37 °C durante 16-20 h, al cabo de las cuales el cultivo se centrifugó (6000 rpm 30 minutos a 5 °C en centrífuga Sorvall RC-5B, Alemania), y se concentró el sobrenadante 10 veces con un evaporador rotatorio Büchi RE130 (Suiza) en un baño a 40 °C. Posteriormente el extracto se ajustó a pH 5 con NaOH 3M y se esterilizó por filtración (membrana de 0,22 µm de diámetro de poro, Sartorius, Alemania). Para evaluar la actividad inhibitoria del ELC, se utilizó la técnica de difusión en agar (Benkerroum *et al*., 1993). Las cepas utilizadas como indicadoras de la actividad antibacteriana se cultivaron en TSB a su respectiva temperatura óptima de crecimiento. Se mezcló 0,5 ml del inóculo con 12 ml TSA que posteriormente se volcó en placas de Petri. Una vez que el agar solidificó, se realizaron pozos con sacabocado estéril (7 mm de diámetro) y en cada uno se colocó 50 µl del ELC a ensayar. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C, al cabo de las cuales se midieron los halos de inhibición producidos. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos como testigo se utilizó caldo MRS concentrado acidificado con ácido láctico a pH 5, coincidente con el pH del ELC.

Para la caracterización preliminar de los metabolitos antimicrobianos presentes en el ELC, se evalúo la estabilidad de su actividad biológica frente a la acción de diferentes enzimas y ante la exposición a tratamientos térmicos de alta temperatura. Para esto, el ELC se expuso ante las siguientes enzimas: catalasa, pronasa E, proteasa, pepsina, tripsina. Cada enzima se preparó en una concentración de 1mg/ml, según recomendación del fabricante (Sigma, USA) y luego se esterilizó por filtración (membrana de 0,22 µm de diámetro de poro, Sartorius, Alemania). Posteriormente, se mezclaron 1 ml de las enzimas esterilizadas con 1 ml del ELC (concentración final de la enzima: 0,5 mg/ml), y la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 h, al cabo de las cuales se evaluó la persistencia de la capacidad inhibitoria de los ELC por el método de difusión en agar descripto anteriormente, utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como bacteria indicadora. Los ensayos se realizaron por triplicado y como testigos se utilizaron la enzima sin el agregado del ELC (blanco de enzima), el ELC sin tratar enzimáticamente y MRS concentrado (blanco del medio). Para evaluar la persistencia de la actividad antimicrobiana ante tratamientos de altas temperaturas, el ELC (1 ml) se incubó en un baño termostático Vicking Modelo Masson (Argentina) a 100 °C durante 30 minutos. Luego se ensayó la actividad inhibitoria remanente mediante el método de difusión en agar. Como cepa indicadora se empleó *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y como testigos se utilizaron MRS concentrado (blanco del medio), sometido a los mismos tratamientos que los utilizados para el ensayo, y ELC sin tratar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

-Identificación molecular

A partir de un cultivo ON de la cepa láctica aislada de arándanos seleccionada por su alta capacidad inhibitoria, se realizó la extracción del ADN genómico por el método de fenol-cloroformo. Para la amplificación de secuencias específicas del ADN que codifican la fracción 16S rRNA se empleó la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando una mezcla que contenía ADN genómico bacteriano, primers (27F y 518R; 27F: 5´-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3 Y 518R: 5´-WTT ACC CGC GCT GCT GG-3´), enzima Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl2 y buffer de reacción. El termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient AG 22331 Hamburg Made in Germany) se utilizó con las siguientes condiciones de ciclado: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 95 ºC por 30 seg, 55 ºC por 30 seg, 72 ºC por 30 seg y 72 ºC por 5 min. El producto amplificado fue purificado por el método Exo-SAP (Werle *et al*.,

1994) y enviado a un laboratorio externo (Macrogen Inc., Corea del Sur) donde fue secuenciado en ambas direcciones utilizando los mismos primers empleados en la amplificación.

- Análisis estadísticos
Los análisis de varianza y de comparaciones múltiples (test de mínimas diferencias significativas de Fisher), empleados para establecer diferencias significativas entre los tratamientos, se realizaron usando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (StatPoint Inc., EEUU).

3. Resultados y Discusión

De un total de 13 cepas aisladas de arándanos, 10 cepas presentaron colonias con características morfológicas similares a las de las bacterias lácticas, por reacción de Gram positiva y catalasa negativa. Según la vía fermentativa de la glucosa, las 10 cepas se clasificaron como heterofermentativas. En la **Tabla 1** se reseñan las características diferenciales de las cepas de bacterias lácticas aisladas de arándanos.

La temperatura óptima de crecimiento de las bacterias lácticas permite determinar si las bacterias son mesófilas o termófilas y por lo tanto el uso industrial al que va a ser destinado. Todas las cepas aisladas desarrollaron en caldo MRS a 15, 30 y 37 °C, en cambio a 45 °C no mostraron desarrollo, por lo tanto, se las considera mesófilas.

La resistencia de las cepas de bacterias lácticas a altas concentraciones de NaCl sin perder su capacidad de crecimiento les confiere amplias posibilidades de ser utilizadas en cultivos iniciadores, bioprotectores o probióticos en una amplia variedad de alimentos (Castillo Arroyo *et al*., 2018). Todas las cepas aisladas de arándanos desarrollaron en caldo MRS adicionado con ClNa (6,5 % p/v), excepto Ar7 y Ar12.

Tabla 1: Características diferenciales de cepas lácticas nativas aislada a partir de arándanos frescos

Cepas	Morfología microscópica	ClNa 6,5%	EPS	IS pH3
Ar1	Bastones cortos	±	±	0,75
Ar2	Diplococos y cadenas cortas	±	+	0,75
Ar3	Diplococos y cadenas cortas	+	+	0,54
Ar4	Diplococos	±	±	0,70
Ar5	Bastones cortos	±	+	0,43
Ar6	Diplococos y cadenas cortas	+	+	0,50
Ar7	Bastones cortos	-	+	0,52
Ar11	Bastones cortos	±	+	0,38
Ar12	Bastones cortos	-	+	0,41
Ar13	Bastones cortos	±	+	0,65

ClNa 6,5 %: crecimiento en caldo MRS adicionado con ClNa (6,5 % p/v); **EPS**: producción de exopolisacáridos; **IS pH3**: Índice de Supervivencia de cultivos expuestos a pH 3 durante 3 horas a 37 °C, calculado aplicando la fórmula 1.

Las BAL que producen EPS son microorganismos de importancia industrial en el desarrollo de productos alimenticios funcionales y se utilizan como cultivos iniciadores o coadyuvantes para desarrollar alimentos fermentados. En la industria de los alimentos estas bacterias mejoran las características reológicas y desempeñan un papel importante como agentes texturizantes y bioespesantes, debido a la naturaleza hidrocoloidal, gelificante, emulsificante y estabilizante de los EPS que producen. Además, diversos investigadores han señalado una variedad de beneficios para la salud que los EPS pueden proporcionar a los consumidores como, por ejemplo, efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales, o anticolesterolémicos (Patel *et al*., 2012; Zannini *et al*., 2016; Fessard y Remize, 2017; Jin *et al.,* 2019). Las 10 cepas aisladas de arándanos sembradas en MRS agar suplementado con sacarosa mostraron producción de EPS, si bien difieren en algunas cepas la producción fue moderada **(Tabla 1)**.

En la generación y diseño de un alimento con microorganismos probióticos adicionados, se debe considerar propiedades intrínsecas de la cepa a emplear, como por ejemplo su capacidad de sobrevivir y colonizar en el tracto gastrointestinal, ser tolerante al pH ácido y a la pepsina del estómago, a sales biliares, a pancreatina en la parte superior del intestino, poseer capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, entre otras (Havenaar y Huis in´t Veld, 1992; Ren *et al*., 2014). Por este motivo en las cepas lácticas aisladas de arándanos se evaluó su capacidad de supervivencia a pH3 **(Tabla 1**) y el desarrollo en MRS agarizado adicionado sales biliares. Todas las cepas aisladas desarrollaron en MRS agarizado adicionado con sales biliares, y las cepas Ar 1 y Ar 2 se destacaron significativamente por su elevado Índice de Supervivencia a pH 3 (0,75).

Todas las cepas aisladas de arándanos mostraron capacidad inhibitoria contra las bacterias indicadoras ensayadas (**Figura 1**). La cepa más inhibitoria fue Ar2 y las especie más inhibidas fueron *Listeria monocytogenes* (24±0,16) y *Salmonella* Enteritidis (24±0,16), seguida por *Escherichia coli* (19,7±0,047).

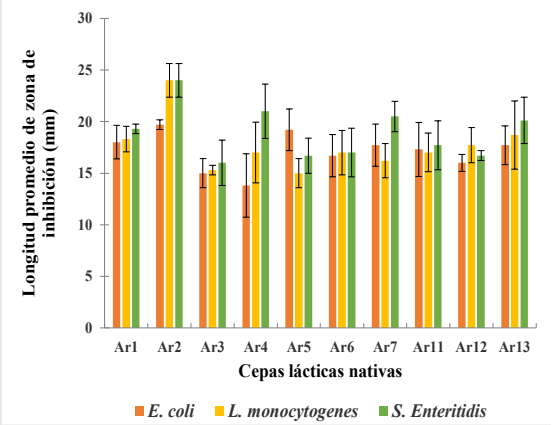


Figura 1: Inhibición producida por cepas aisladas de arándanos sobre *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis.

Debido a que la cepa Ar2 mostró mayor capacidad inhibitoria frente a las cepas indicadoras ensayadas y además, resistió pH 3, sales biliares 1 % y produjo exopolisacáridos (EPS), se seleccionó para los ensayos de determinación de metabolitos extracelulares antimicrobianos y para la identificación taxonómica molecular.

Los resultados obtenidos de la acción inhibitoria del ELC de la cepa Ar2 se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Actividad inhibitoria del ELC de la cepa Ar2 contra bacterias indicadoras y patógenas

Cepas patógenas o indicadoras	Halos de inhibición (mm)
Bacillus cereus MA 130	11,5±0,8
C. sakazakii MA13	11,1±0,2
E. coli ATCC 35218	-
E. coli O:157 MA 61	-
Listeria innocua CIP 8011	10,5±0,5
L. monocytogenes ATCC 7644	11,7±0,4
L. monocytogenes tipo 1 BE 16/96	11±0,1
Listeria seeligeri 19/02	13,5±0,5
L.welshimeri BE313/01	10,9±0,5
P. aeruginosa ATCC 2583	12,7±0,5
S. Enteritidis MA 44	13,4±0,4
S. aureus MA 106	11,2±0,4

Dado que el ELC de la cepa Ar2 presentó marcada actividad inhibitoria frente a todas las cepas del género Listeria ensayadas, se decidió usar *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como cepa indicadora para la caracterización preliminar de los metabolitos antimicrobianos contenidos en el ELC, debido a que esta especie ha estado involucrada en numerosos brotes de ETA vinculados con el consumo de frutas y hortalizas (CDC, 2012; 2015a; 2015b; 2016a; 2016b; EFSA and ECDC, 2019; 2021).

La actividad inhibitoria de los metabolitos antimicrobianos presentes en el ELC, fue afectada por la acción de enzimas proteolíticas, pero permaneció estable frente a los tratamientos térmicos y la catalasa. Estos resultados sugieren, por consiguiente, que la inhibición observada no es debida a la producción de peróxido de hidrógeno, y que la cepa Ar2 produciría una sustancia proteica termorresistente del tipo bacteriocina con efecto inhibidor frente a *Listeria monocytogenes.*

De acuerdo con el resultado de la identificación molecular de (amplificación por PCR de fragmentos de aproximadamente 500 pb de gen que codifica la fracción 16S rRNA y posterior secuenciación) la cepa nativa Ar2, seleccionada para su uso como bioconservante, probióticos o espesante, se identificó como perteneciente a la especie *Weissella confusa,* con 99 % de similitud.

Las propiedades observadas en la cepa nativa *Weissella confusa* Ar2 son comparables con los obtenidos por otros investigadores con otras cepas del mismo género o especie. La actividad antimicrobiana es una propiedad importante para que una cepa pueda ser utilizada como probiótica. *Weissella confusa* Ar2, inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativa: estos resultados son similares a los reportados por Trias *et al.* (2008) que encontraron que dos cepas de *Weissella cibaria* aisladas de acelga y tomates, inhibieron microorganismos patógenos asociados con frutas y vegetales frescos, o por Serna *et al*. (2010) quienes reportaron actividad antimicrobiana de una cepa de *Weissella confusa* contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae.*

Con respecto a la producción de EPS observada en *W. confusa* Ar2, se destaca que esta propiedad ha sido también observada con cepas de la misma especie aisladas por otros investigadores (Jin *et al*.,2019), y lo mismo ocurre con respecto a la capacidad de crecer con altas concentraciones de cloruro de sodio (Lee *et al,* 2012).

Por último, con respecto a la potencialidad de cepas de *W. confusa* para ser empleadas como probióticas, los resultados obtenidos en este trabajo son comparables, en lo referente a la supervivencia a pH 3,0 y resistencia a las sales biliares, a los presentados por Lee *et al*. (2012) y Wang et al. (2020), con cepas aisladas a partir de heces, o por Ayeni *et al*. (2011) y Sharma *et al*. (2018), con cepas aisladas a partir de alimentos fermentados.

4. Conclusiones

En este trabajo se aislaron diferentes cepas autóctonas de bacterias lácticas a partir de arándanos. Se identificó por método molecular a *Weissella confusa* Ar2, cepa productora de exopolisacáridos, con alta capacidad inhibitoria de diversos microorganismos patógenos, que resistió pH 3 y sales biliares y que puede crecer con elevada concentración de ClNa. Además, los ELC de *W. confusa* Ar2 tuvieron efecto inhibitorio contra *Listeria* spp. y las cepas específicas testeadas de *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis y *Staphylococcus aureus*, La capacidad inhibitoria observada contra *Listeria monocytogenes* es debida aparentemente a sustancias de naturaleza proteica termorresistentes, tipo bacteriocina. Estos resultados justifican evaluaciones adicionales de *W. confusa* Ar2 para su potencial uso en la industria alimentaria, ya sea como bioprotectora, como probiótica o como productora de bioespesantes naturales.

5. Referencias

Akbar, A.; Ali, I.; Anal, A. K. (2016). *Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety*, The Journal of Animal & Plant Sciences, 26 (4), 938-948.

Ananou, S.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. (2007). *Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods*. En Méndez-Vilas, A. (Ed.) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, vol. 1. Ed. Formatex, España.

Ayed, L.; M´hir, S.; Hamdi, M. (2020). *Microbiological, biochemical, and functional aspect of fermented vegetable and fruit beverages*, Journal of Chemistry 2020, 1-12.

Ayeni, F. A.; Sánchez, B.; Adeniyi, B. A.; Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. (2011). *Evaluation of the functional potential of Weissella and Lactobacillus isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine*, International Journal of Food Microbiology 147, 97-104.

Behare, P.V.; Singh, R.; Kumar, M.; Prajapati, J. B.; Singh, R. P. (2009). *Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A revie*, Journal Food Science Technology 46, 1–11.

Benkerroum, N.; Ghouati, Y.; Sandine, W.E.; Tantaoui-Elar, A. 1993. *Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins,* Letters in Applied Microbiology, 17, 78-81.

Bernal Castro, C.A.; Díaz Moreno, C.; Gutiérrez Cortés, C. (2017). *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas,* Revista Chilena de Nutrición 44 (4), 383-392.

Bouzaiene, T.: Lasram, S.; Ziadi, M.; Hadda-Imen, O.; Zohra, H., Hamdi, M. (2019). *Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and in vitro detoxification of ochratoxin A*, Annals of Microbiology 69, 17–27.

Carstens, C.K.; Salazar, J.K.; Darkoh, C. (2019). *Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017*, Frontiers in Microbiology 10, 2667.

Castillo Arroyo, P.L.; Betancur Hurtado, C.A.; Pardo Pérez, E. (2018). *Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia*, Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú 29 (2), 438-448.

CDC (2012). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado* (Final Update). Disponible en: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html. Fecha de consulta: 6/10/2021.

CDC. (2015a). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros. Apples* (Final Update). Disponible en: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html. Fecha de consulta: 6/10/2021.

CDC (2015b). *Wholesome Soy Products, Inc. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases* (Final Update) Disponible en: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html. Fecha de consulta: 6/10/2021.

CDC (2016a). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables* (Final Update) Disponible en: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html. Fecha de consulta: 6/10/2021.

CDC (2016b). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility* (Final Update) Disponible en: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html. Fecha de consulta: 6/10/2021.

Di Cagno, R.; Cardinali, G.; Minervini, G.; Antonielli, L.; Rizzello, C. G.; and Ricciuti, P.; Gobbetti, M. (2010). *Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (Ananas comosus L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing*. Food Microbiology 27: 381–389.

EFSA and ECDC. (2019). *The European Union One Health 2018 Zoonoses Report*. Disponible en: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5926. Fecha de consulta: 5/10/2021.

EFSA and ECDC. (2021). *Multi-country outbreak of* Salmonella *Braenderup ST22, presumed to be linked to imported melons*, Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ROA_S_Braenderup-ST22_UI-719_2021.pdf. Fecha de consulta: 27/10/2021.

Emerenini, E., Afolabi, O.; Okolie, P.; Akintokun, A. (2013). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis*, British Microbiology Research Journal 3 (3), 368-377.

Fessard, A.; Remize, F. (2017). *Why Are Weissella spp. Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation?* Fermentation 3 (3), 1- 31.

Fontana, L.; Bermudez-Brito, M.; Plaza-Diaz, J.; Muñoz-Quezada, S.; Gil, A. (2013). *Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics*, British Journal of Nutrition 109, S35–S50.

Garriga, M.; Pascual, M.; Monfort, JM.; Hugas, M. (1998). *Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts,* Journal of Applied Microbiology 84, 125–132.

González, F.; Mans M., Raffellini S., Fantuzzi L. (1995). *Preliminary test on the inhibitory effect of Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum isolated from raw milk on Gram negative psychrotrophic bacteria*, Microbiologie, Aliments, Nutrition 13 (1), 55-59.

Grosur-Tudor, S.S.; Zamfir M. (2011). *Isolation and characterization of lactic bacteria from romanian fermented vegetables*, Romanian Biotechnological Letters 16, 148-154.

Havenaar R.; Huis in´t Veld J. H. J. (1992). *Probiotics: A general view. In: The lactic acid bacteria in health & Disease*, BJB Wood (Ed.) Elsevier Applied Science, London.

Jin, H.; Jeong, Y.; Yoo, S‑H.; Johnston TV.; Ku, S., Ji, G.E. (2019). *Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing Weissella confuse VP30 from young children's feces*, Microbial Cell Factories 18 (110), 1-13.

Kociubinski, G.; Pérez, P;, De Antoni, G. (1999). *Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacterial*, Journal Food Protection 62, 905-912.

Lee, K.W.; Park, J.Y.; Jeong, H. R., Heo, H. J., Hand, N. S., Kim J.H. (2012). *Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces*, Anaerobe 1 (1), 96-102.

Linares-Morales, J.R.; Cuellar-Nevárez, G.E.; Rivera-Chavira, B.E.; Gutiérrez-Méndez, N.; Pérez-Vega, S.B. Nevárez-Moorillón, G.V. (2020). *Selection of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables based on their antimicrobial and enzymatic activities*. Foods 9 (10), 1399: 1-14.

Oliveira Elias, S.; Tombini Decol, L.; Tondo, C.E. (2018). *Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014*, Food Quality and Safety 2, 173-181.

OMS. (2018). *Alimentación sana*. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet. Fecha de acceso: 15/10/2021.

O´Sullivan, L.; Ross, R.; Hill, C. (2002). *Potencial of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality*, Biochimie 84, 593-604.

Patel, A.; Prajapati, J.B.; Holst, O., Ljungh, A. (2014). *Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products*, Food Bioscience 5, 27-33.

Patel, S.; Majumder, A.; Goyal, A. (2012). *Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*, Indian Journal Microbiology 52, 3–12.

Ren, D.; y otros trece autores (2014). *In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of Lactobacillus strains isolated from fermented food and human intestine*. Anaerobe 30: 1-10.

Rodriguez, S. del C.; Gutierrez, D.R..; Sgroppo, Y.S.C. (2015). *Productos vegetales IV GAMA*, Aspectos generales, Simiente 85 (1-2), 1-12.

Ruiz Rodríguez, LG.; L.; Bleckwedel, J.; Medina, R.; De Vuyst, L.; Hebert, ME.; Mozzi, F. (2019). *Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina*, Frontiers in Microbiology 10, 1-26.

Sharma, S.; Kandasamy, S.; Kavitake, D.; Shetty, P.H. (2018). *Probiotic characterization and antioxidant properties of Weissella confusa KR780676, isolated from an Indian fermented food*, LWT 97, 53-60.

Serna Cock, L.; Valencia L.; Campos, R. (2010). *Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de Weissella confusa contra Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae*, Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Antioquia 55, 55-65.

Trias, R.; Bañeras, L.; Badosa, E.; Montesino, E. (2008). *Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria*, International Journal of Food Microbiology 123, 50–60.

Valero, D. (2018). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas o de IV Gama: cambios en los compuestos bioactivos. Horticultura*. Disponible en: https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/216797-Frutas-y-hortalizas-minimamente-procesadas-o-de-IV-Gama-cambios-en-compuestos-bioactivos.html. Fecha de acceso: 15/10/2020.

Vijaya Kumar, B.; Vijayendra, SVN.; Reddy, OVS. (2015). *Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review*, Journal Food Science Technology 52, 6112–6124.

Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A. 2003. *Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*, Food Research International 36, 895-904.

Wang, W.; Liu, W.; Chu, W. (2020). *Isolation and preliminary screening of potentially probiotic Weissella confusa strains from healthy human feces by culturomics*, Microbial Pathogenesis 147, 1-7.

Werle, E.; Schneider, C.; Renner, M.; Völker, M.; Fiehn, W. (1994). *Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing*, Nucleic Acids Research 22 (20), 4354-4355.

Zannini, E.; Waters, D.M.; Coffey, A.; Arent, E. (2016). *Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides*, Applied Microbiology and Biotechnology 100 (3), 1121-1135.

12TCA - Efecto de la tecnología y condiciones de secado en el contenido de componentes bioactivos y minerales de microalga *Scenedesmus obliquus*.

Effect of drying technology and conditions on bioactive component and mineral content of microalgae *Scenedesmus obliquus*.

Luz Marina Zapata[1,2], Cecilia Cabrera[1], Evelin Carlier[1], Mercedes Rasia[1], Gianella Itatí Dalzotto[1], Sofía Carla Aumenta[1], Tomás Russo[1], Fiama Ayelén Schiebert[1], Natalia Sacks[1]

1. Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos. Avenida Monseñor Tavella 1450-Concordia-3200.
2. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos (ICTAER). Avenida Monseñor Tavella 1450-Concordia-3200, luzmarina.zapata@uner.edu.ar

Resumen

Las microalgas son fuentes de nutrientes, pero se requieren tecnologías para prolongar su vida útil. Se estudió el efecto de las tecnologías de liofilización (L) y secado por atomización (SA) en componentes bioactivos y minerales de microalga *Scenedesmus obliquus*. La microalga fue cultivada en medio Allen y Arnon en fotobiorreactores de 25L. Cuando se alcanzó la fase estacionaria, las microalgas fueron cosechadas y deshidratadas por L y SA. En la L se trabajó con discos de 2cm de diámetro y espesores de 5, 20 y 20mm. En el SA se estudiaron 3 factores experimentales: material de pared (maltodextrina y gelatina), temperatura de ingreso de aire al secadero (130 y 150°C) y caudal de alimentación (6 y 9mL/min). Las variables respuesta fueron: humedad (H), carotenoides totales (CT), fenoles totales (FT) y minerales (M). En la L se logró mayor retención de los analitos de interés en los discos de microalga de 5mm de espesor; siendo H=5,98g/100g, CT=91,78mg/g, FT=30,08mg/g y M=0,04-13,24mg/g. En el SA el mejor tratamiento fue con maltodextrina, temperatura de 130°C y 6 mL/min, logrando H=6,85g/100g, CT=16,91mg/g, FT=16,87mg/g y M=0,04-13,24mg/g, dependiendo del mineral. Se concluye que con la liofilización se alcanzaron mayores concentraciones de componentes de interés, pero ambas tecnologías pueden ser consideradas para la deshidratación de microalgas.

Palabras clave: microalga, liofilización, secado por atomización.

Abstract

Microalgae are sources of nutrients, but technologies are required to extend their useful life. The effect of lyophilization (L) and spray drying (SD) technologies in bioactive and mineral components of microalga *Scenedesmus obliquus* was studied. Microalga was cultivated in Allen and Arnon medium in 25L photobioreactors. When stationary phase was reached, microalgae were harvested and dehydrated by L and SD. In lyophilization, discs of 2cm in diameter and a thickness of 5, 20 and 20mm were utilized. In SD three experimental factors were studied: wall-material (maltodextrin and gelatin), air inlet temperature to the dryer (130 and 150°C) and feed flow (6 and 9mL/min). Response variables were: moisture (M), total carotenoids (TC), total phenols (FT) and minerals (M). Lyophilization achieved a major retention of analytes of interest in microalga discs of 5mm thickness; where M=5.98g/100g, TC=91.78mg/g, TF=30.08mg/g and M=0.04-13.24mg/g. The best spray drying treatment was with maltodextrin, at 130°C and 6mL/min, achieving H = 6.85g/100g, TC=16.91mg/g, FT=16.87mg/g and M=0.04 -13.24mg/g, depending on the mineral. In conclusion, with lyophilization higher concentrations of components of interest were reached, both technologies could be considered for the dehydration of microalgae.

Keywords: microalgae, lyophilization, spray drying.

1. Introducción

Las microalgas constituyen una fuente de metabolitos secundarios de interés para la industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, tales como proteínas, vitaminas, antioxidantes, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, minerales (Quevedo et al., 2008; Plaza del Moral., 2010; De Marchin et al., 2015; Tramontin et al., 2018;).

Por su elevado contenido de nutrientes con propiedades beneficiosas para la salud humana, ciertas microalgas se consideran alimentos funcionales (Quevedo et al., 2008), que son de interés en la industria alimentaria. Varios estudios han reportado que bajo diferentes condiciones de estrés las microalgas producen compuestos bioactivos como un mecanismo de protección celular (Dammak et al., 2018).

Estudios realizados con microalgas han atraído la atención de las industrias farmacéutica y de alimentos debido a su alto contenido de compuestos bioactivos. Sin embargo, su alto contenido de humedad contribuye a la degradación de estos compuestos y hace que las microalgas sean muy perecederas (Silva et al., 2019). Por lo tanto, se debe emplear alguna técnica de preservación como el secado, que facilite el almacenamiento prolongado y el fácil transporte desde los sitios locales de producción de microalgas a las plantas de procesamiento (Costa et al., 2016).

La liofilización es un proceso de secado utilizado en la industria de los alimentos, farmacéutica y biotecnológica, con el fin de estabilizar y conservar productos, reduciendo así las pérdidas de compuestos lábiles en virtud de que es una tecnología que trabaja a muy bajas temperaturas. El proceso consiste en una congelación del material de interés, seguida de la sublimación del hielo a presión subatmosférica (Cortés et al., 2015).

El secado por atomización también es una técnica ampliamente utilizada en la industria alimentaria, que consiste en la formación de gotas pequeñas dentro de la cámara de secado, la que se encuentra a elevada temperatura, dando lugar a la formación de polvo en donde se encuentran microencapsulados los analitos de interés (Cardona-Tangarife, et al., 2021). Este proceso se compone de cuatro pasos básicos: i) atomización, ii) contacto entre gotas y aire caliente, iii) evaporación de agua y iv) separación aire-polvo. (Sagar y Suresh-Kumar, 2010). Se caracteriza por ser una técnica rápida, altamente reproducible, apropiada para aplicaciones industriales y cuyos costos de procesamiento son relativamente bajos (Desai y Park, 2005). En el secado por atomización se suelen utilizar materiales de pared, como maltodextrina, goma arábiga, gelatina, entre otros, que sirven como protección de los analitos de interés; tales como los de la presente investigación, carotenoides, compuestos fenólicos y minerales (Bonilla-Ahumada et al., 2018).

Referido a la temperatura de trabajo algunos autores señalan que el secado por atomización es una técnica que tiene la capacidad de evaporar la humedad rápidamente y que mantiene una temperatura baja en las partículas de interés (Cardona-Tangarife, et al., 2021), otros mencionan que el deterioro por altas temperaturas en el producto es relativamente pequeño debido a los cortos tiempos de procedimiento (Cortés-Rojas et al., 2015; Campelo et al., 2018), mientras que hay publicaciones que indican que la principal desventaja es el empleo de elevadas temperaturas necesarias en el proceso de evaporación del solvente, las cuales pueden afectar los analitos que se desean preservar (Desai y Park, 2005).

Por tal motivo es que se considera que deben realizarse estudios para cada matriz particular para conocer el efecto de tecnologías y variables de secado en los compuestos bioactivos de interés.

El objetivo de la investigación fue estudiar el efecto de las tecnologías de liofilización y secado por atomización en los componentes bioactivos y minerales presentes en microalga *Scenedesmus obliquus*.

2. Materiales y métodos

a. Microalga y obtención de cultivo

Se trabajó con microalga autóctona de la provincia de Entre Ríos (Argentina) *Scenedesmus obliquus* aislada por el grupo de investigación del Embalse Salto de Grande a 30° 59’ 19,07’’ de latitud sur y 57° 54’ 19,24’’ de latitud oeste (Jimenez-Veuthey et al., 2018). La microalga fue cultivada en medio Allen y Arnon modificado en fotobiorreactores de 25 L (Figura 1) dentro de cámara de cultivo a 25 ± 1 °C, 55-60 % HR y fotoperíodo luz:oscuridad donde la irradiancia se fue modificando según se señala a continuación: 8,75 µmol/(m2 s) – 2 h; 17,50 µmol/(m2 s) – 3 h; 26,25 µmol/(m2 s) – 6 h; 17,50 µmol/(m2 s) – 3 h, 8,75 µmol/(m2 s) – 2 h y oscuridad 8 h.

Para mantener el cultivo de manera homogénea se colocó aireación continua en cada fotobiorreactor utilizando un compresor (GAST, 3HBE-31T-M303X) cuya función fue enviar aire a través de tubería de 4 mm de diámetro interior y 6 mm de diámetro conectada a una válvula de 6 mm. La inyección de aire fue de 0,78 Laire/(min Lcultivo).

Figura 1. Cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactores de 25 L.

Para conseguir un medio de cultivo con elevada concentración de microalgas y lograr mayor concentración de componentes biactivos el día 18 de cultivo se incorporó al medio de cultivo 0,24 g/L de úrea y 5,02 g/L de acetato de sodio como fuentes de nitrógeno y carbono. El día 35 comenzó la fase estacionaria y en el día 40 se procedió a la concentración del cultivo microalgal. Para ello se agregó una solución de quitosano al 0,8 % acidificada con ácido acético al 1 % con el fin de provocar la floculación de las microalgas y obtener un cultivo microalgal concentrado.

b. Secado por liofilización

El cultivo microalgal concentrado se centrifugó y las microalgas fueron recolectadas para llevar a cabo el secado por liofilización. La biomasa microalgal se moldeó en cilindros de 2 cm de diámetro y en espesores de 5, 10 y 20 mm. Los cilindros fueron congelados en freezer doméstico y liofilizados en liofilizador (HETO DRYWINER) a -90 °C hasta peso constante. A continuación se cuantificaron: fenoles totales, carotenoides totales, minerales y humedad.

c. Secado por atomización

Material de pared

El cultivo microalgal concentrado fue mezclado con material de pared previo a la etapa de secado y el conjunto se mantuvo en fotobiorreactores durante 24 h. Se trabajó con dos materiales de pared: maltodextrina (20 %) y gelatina (2 %).

Secado por atomización

La deshidratación de la biomasa se realizó por secado por atomización en Mini Spray Dryer (Büchi Labortechnik AG, Modelo: B-290) (Figura 1).

Figura 2. Secado por atomización de microalga Scenedesmus obliquus en Mini Spray Dryer (Büchi Labortechnik AG, Modelo: B-290).

En el secado por atomización se llevaron a cabo 12 tratamientos según se señala a continuación.

1. M-150°C-6. Material de pared: 20 % de maltodextrina, temperaturas del aire de entrada: 150 °C, caudal de alimentación: 6 mL/min. La temperatura de salida estuvo determinada por la temperatura y caudal antes mencionados. Para este tratamiento la temperatura de salida fue 85 °C.

2. M-150°C-9. Material de pared: 20 % de maltodextrina, temperaturas del aire de entrada: 150 °C, caudal de alimentación: 9 mL/min, temperatura de salida: 75 °C.

3. M-130°C-6. Material de pared: 20 % de maltodextrina, temperaturas del aire de entrada: 130 °C, caudal de alimentación: 6 mL/min, temperatura de salida: 73 °C.

4. M-130°C-9. Material de pared: 20 % de maltodextrina, temperaturas del aire de entrada: 130 °C, caudal de alimentación: 9 mL/min, temperatura de salida: 58 °C.

5. G-150°C-6. Material de pared: 2 % de gelatina, temperaturas del aire de entrada: 150 °C, caudal de alimentación: 6 mL/min, temperatura de salida: 85 °C.

6. G-150°C-9. Material de pared: 2 % de gelatina, temperaturas del aire de entrada: 150 °C, caudal de alimentación: 9 mL/min, temperatura de salida: 75 °C.

7. G-130°C-6. Material de pared: 2 % de gelatina, temperaturas del aire de entrada: 130 °C, caudal de alimentación: 6 mL/min, temperatura de salida: 73 °C.

8. G-130°C-9. Material de pared: 2 % de gelatina, temperaturas del aire de entrada: 130 °C, caudal de alimentación: 9 mL/min, temperatura de salida: 58 °C.

9. 150°C-6. Biomasa microalgal sin material de pared, temperaturas del aire de entrada: 150 °C, caudal de alimentación: 6 mL/min, temperatura de salida: 85 °C.

10. 150°C-9. Biomasa microalgal sin material de pared, temperaturas del aire de entrada: 150 °C, caudal de alimentación: 9 mL/min, temperatura de salida: 75 °C.

11. 130°C-6. Biomasa microalgal sin material de pared, temperaturas del aire de entrada: 130 °C, caudal de alimentación: 6 mL/min, temperatura de salida: 73 °C.

12. 130°C-9. Biomasa microalgal sin material de pared, temperaturas del aire de entrada: 130 °C, caudal de alimentación: 9 mL/min, temperatura de salida: 58 °C.

La presión de pulverización se mantuvo constante en 45 bar.

En el material microencapsulado en cada tratamiento se cuantificó la humedad, concentración de carotenoides totales, fenoles totales y minerales.

d. Técnicas analíticas

Fenoles Totales. Se cuantificaron mediante el método que consiste en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Copia et al., 2012; Zia y Alibas, 2021). Este reactivo es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolíbdico en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos de la muestra originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno. Se midió la absorbancia del color azul desarrollado a 760 nm en espectrofotómetro HACH, DR-6000. La curva de calibrado se construyó tomando como referencia estándar de ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g_{ms} (ms: materia seca).

Carotenoides totales. Por Espectroscopía con espectrofotómetro HACH, DR-6000 midiendo la absorbancia a 480 nm (Lira et al., 2017; Arredondo-Vega et al., 2007). Se construyó curva de calibrado con β-caroteno. Los resultados se expresaron en mg β-caroteno/gms.

Minerales (Sodio, Potasio, Magnesio, Calcio, Hierro, Zinc y Manganeso): Previo a la cuantificación de minerales la biomasa deshidratada fue digerida. Para ello a 2 g de biomasa deshidratada y se mezcló con 10 mL de ácido nítrico 70%, se llevó a cabo la digestión en plataforma de reacción por microondas (ANTON PAAR, MULTIWAVE PRO). A continuación se llevó a volumen con agua bidestilada y se inyectó en Espectrómetro de Emisión Atómica de Plasma (Agilent, 4200 MP-AES) (Normas APHA-Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 3111). Para cada mineral se utilizaron estándares AccuTrace. Los resultados se expresaron en mg/ kg_{ms}.

Humedad. Según metodología AOAC. Para ello 1 g de muestra será calentada a 105 °C hasta obtener peso constante. Los resultados se expresaron en g/100g.

e. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente con software STATGRAPHICS® Centurión XVI mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

3. Resultados y Discusión

a. Cultivo microalgal concentrado

Las microalgas en la fase estacionaria alcanzaron una densidad celular de $3,2\times10^7$ células/mL. A los 40 días de cultivo se efectuó la etapa de coagulación de las microalgas con quitosano para lograr un medio con mayor concentración de microalgas al momento de efectuar la etapa de secado.

Luego de 5 min de agregado el quitosano se produjo la floculación y las microalgas se localizaron en mayor proporción en la parte superior de los fotobiorreactores, por lo que se extrajo parte del medio de cultivo con menor

proporción de microalga quedando los fotobiorreactores con medio de cultivo con una concentración mayor de microalgas. Así, la proporción de microalgas frescas pasó de 1% a 10 % en el medio de cultivo.

El medio de cultivo con menor concentración de microalgas se colocó en otros fotobiorreactores para continuar con el cultivo de microalgas.

b. Secado *por liofilización*

La apariencia de la biomasa microalgal liofilizada se puede observar en la Figura 3. El tiempo de secado fue de 20, 32 y 48 h para los cilindros de 5, 10 y 20 mm de espesor; respectivamente. En este tiempo no se tuvo en cuenta el tiempo correspondiente a la congelación.

Figura 3. Microalga *Scenedesmus obliquus* deshidratada por liofilización.

El contenido de componentes bioactivos y de minerales varió según el espesor de los cilindros de biomasa microalgal según se muestra en la Tabla 1. La concentración de carotenoides totales para los cilindros de 5 mm de espesor fue 1,7 veces más elevada que para los cilindros de 10 y 20 mm; mientras que el contenido de fenoles totales en dichos cilindros fue 14 veces superior que los fenoles totales presentes en los cilindros de 10 mm y 38 veces más alta que la obtenida para los cilindros de 20 mm.

Tabla 1. Contenido de componentes bioactivos y minerales en discos de microalga liofilizada.

Componente	Espesor 5 mm	Espesor 10 mm	Espesor 20 mm
Humedad, g/100 g	5,98±0,61 [a]	6,20±0,68 [a]	6,31±0,65 [a]
Carotenoides totales, mg β-caroteno/g_{ms}	91,75±8,16 [a]	53,09±5,33 [b]	52,49±3,83 [b]
Fenoles totales, mg EAG/g_{ms}	30,08±2,45 [a]	2,14 ,20 [b]	0,79±0,06 [c]
Sodio, mg/g_{ms}	13,24±0,01 [a]	9,30±0,01 [b]	13,27±0,01 [a]
Potasio, mg/g_{ms}	9,54±0,01 [b]	10,19±0,10 [a]	9,58±0,01 [b]
Calcio, mg/g_{ms}	3,38±0,02 [b]	3,10±0,08 [b]	4,17±0,04 [a]
Magnesio, mg/g_{ms}	1,95±0,01 [a]	1,86±0,02 [b]	1,74±0,05 [c]
Hierro, mg/g_{ms}	0,80±0,04 [b]	1,07±0,10 [a]	0,69±0,01 [c]
Zinc, mg/g_{ms}	0,04±0,00 [a]	0,04±0,00 [a]	0,03±0,00 [b]

En cuanto al contenido mineral, si bien hubo diferencias para los distintos espesores, estas diferencias no fueron tan importantes como para los compuestos carotenoides y fenólicos.

En términos generales se puede señalar que cuanto menor fue el espesor de los cilindros mayor fue contenido de los analitos de interés.

c. Secado por atomización

En la Figura 4 se puede observar los polvos de biomasa microalgal obtenidos para diferentes tratamientos. Los materiales encapsulados con maltodextrina tuvieron una coloración ligeramente verdosa y los encapsulados con gelatina, una tonalidad verdosa.

Figura 4. Microalga *Scenedesmus obliquus* microencapsulada con maltodextrina (izquierda) y gelatina (derecha) como materiales de pared.

Los tiempos de secado con esta tecnología fueron muy cortos. Los tratamientos llevados a cabo a 130 °C tuvieron un tiempo de retención del producto en el secadero de 7 s y a 150 °C, 10 s.

Humedad

El contenido de humedad cuando se trabajó con 20 % de maltodextrina como material de pared estuvo comprendido entre 5,88 y 9,65 g/100 g y cuando se usó 2 % de gelatina, entre 8,00 y 24,60 g/100 g (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas entre los valores medios de contenido de humedad de los tratamientos M-150 °C -6, M-150 °C-9 y M-130 °C –6 como tampoco entre M-130 °C -9 y G-130 °C -9; entre las medidas de los demás tratamientos se obtuvieron diferencias significativas.

Tabla 2. Contenido de humedad y de componentes bioactivos en biomasa de microalga *Scenedesmus obliquus* deshidratada por atomización.

Tratamiento	Humedad g/100g	Carotenoides totales mg/g_{ms}	Fenoles totales mg/g_{ms}
M-150°C-6	5,93±0,27 ^{a}	14,88±0,45 ^{a}	14,11±0,73 ^{a}
M-150°C-9	5,88±0,21 ^{a}	17,13±1,20 ^{b}	7,23±0,28 ^{b}
M-130°C-6	6,85±0,43 ^{a}	16,91±1,02 ^{bc}	16,87±0,85 ^{c}
M-130°C-9	9,65±0,42 ^{b}	19,06±0,62 ^{c}	14,87±0,91 ^{a}
G-150°C-6	24,60±1,15 ^{c}	19,23±0,91 ^{c}	0,88±0,06 ^{d}
G-150°C-9	8,00±0,66 ^{d}	19,28±0,95 ^{c}	3,41±0,18 ^{e}
G-130°C-6	17,43±0,80 ^{e}	17,96±0,74 ^{bc}	8,13±0,84 ^{b}
G-130°C-9	9,06±0,36 ^{b}	23,98±0,96 ^{d}	4,65±0,15 ^{f}
150°C-6	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		
150°C-9	26,85±2,15 ^{f}	49,48±1,97 ^{e}	3,06±0,17 ^{e}
130°C-6	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		
130°C-9	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		

Con maltodextrina el tratamiento que consistió en una menor temperatura de entrada de aire al secadero y mayor caudal de alimentación (M-130 °C-9) fue el que mostró más elevado contenido de humedad, alcanzando los 9,65 ± 0,42 g/100 g; mientras que los tratamientos que consistieron en temperatura de secado más elevada o menor caudal tuvieron una humedad entre 5,88 y 6,85 g/100 g. Este fenómeno fue informado por Bonilla-Ahumada et al. (2018) argumentando que la humedad relativa de los productos microencapsulados disminuye a medida que aumenta la temperatura de secado.

Con 2 % de gelatina los tratamientos que consistieron en un caudal de alimentación de 6 mL/min tuvieron valores muy elevados de humedad, 24,60 ± 1,15 g/100 g para el caso de G-150 °C -6 y 17,43 ± 0,80 para G-130 °C -6. En G-150 °C -9 se obtuvo el valor más bajo de humedad (8,00 ± 0,66 g/100g).

Referido al material de pared, con maltodextrina la biomasa microalgal deshidratada tuvo menor contenido de humedad que con gelatina, con excepción de los tratamientos M-130 °C -9 y G-130 °C -9; que no tuvieron diferencias significativas. La mayor humedad en los tratamientos con gelatina fue atribuida a que la solubilidad de la gelatina en agua es afectada por la temperatura. En agua fría la gelatina es relativamente insoluble, mientras que en agua caliente solubiliza fácilmente. Por lo que el mayor contenido de humedad en la biomasa de microalga microencapsulada con gelatina, especialmente en el tratamiento G-150 °C-6 fue atribuido a la mayor hidratación de este material de pared durante el secado por atomización.

Estos resultados no son coincidentes con los obtenidos por Bonilla-Ahumada et al. (2018), quienes obtuvieron menor humedad en la microalga Tetraselmis chuii deshidratada cuando utilizaron como material de pared maltodextrina:goma arábiga (60:40) que cuando utilizaron gelatina. Estos autores justificaron sus resultados señalando que la gelatina al ser una proteína es insoluble en agua, por lo que durante el secado ésta no retiene tanta humedad como los carbohidratos.

Carotenoides totales

Cuando se utilizó maltodextrina como material de pared el contenido de carotenoides totales en las microalgas deshidratadas estuvo comprendido entre 14,88 y 19,06 mg β-caroteno/gms, observándose diferencias significativas entre todos los tratamientos, excepto entre M-150 °C -9 y M-130 °C -6 (Tabla 2).

Tanto para la temperatura del aire de entrada al secadero de 150 °C como para 130 °C la concentración de carotenoides totales fue superior al caudal de alimentación de 9 mL/min; mientras que para un mismo caudal de alimentación el contenido de este componente bioactivo fue superior a la menor temperatura de trabajo.

Se puede ver en la tabla que el tratamiento M-130°C-9 fue con el que se obtuvo mayor concentración de carotenoides totales. Sin embargo, de los tratamientos con maltodextrina este fue el que dio como producto una biomasa microalgal deshidratada con mayor contenido de humedad (9,65 ± 0,42 g/100g). Desde el punto de vista de la vida útil del producto es de interés lograr menores contenidos de humedad, por lo que los tratamientos M-150 °C -9 y M-130 °C-6 serían mejores ya que se lograron biomasas deshidratadas con 5,88 ± 0,21 y 6,85 ± 0,43 g/100 g de humedad y concentraciones de carotenoides totales de 17,13 ± 1,20 y 16,91 ± 1,02 mg β-caroteno/gms; respectivamente.

Cuando el material de pared consistió en gelatina el rango de variación de carotenoides totales estuvo comprendido entre 17,96 y 23,98 mg β-caroteno/gm. Se encontró diferencias estadísticas significativas entre las medias de carotenoides totales de los tratamiento G-130°C-9 y las medias de los demás tratamientos; sin embargo, no hubo diferencias entre las concentraciones de los tratamientos G-150°C-6, G-150°C-9 y G-130°C-6.

Para este material de pared el contenido de carotenoides totales se conservó mejor cuando el

secado se llevó a cabo con 2 % de gelatina, temperatura de entrada de aire al secadero de 130 °C y caudal de alimentación de 9 mL/min; logrando 23,98 ± 0,96 mg β-caroteno/gms y una humedad de 9,06 ± 0,36 g/100 g. Esta humedad podría ser elevada desde el punto de vista de la caducidad del producto. Para los tratamientos con gelatina, la biomasa deshidratada con menor humedad se logró con el tratamiento G-150 °C –9 con 8,00 ± 0,66 g/100g de humedad y 24 % menos de carotenoides que el tratamiento G-150 °C -9.

Para las mismas condiciones de temperatura y caudal y diferente material de pared, el contenido de carotenoides totales fue superior cuando se utilizó 2 % de gelatina, con excepción del tratamiento G-130 °C -6 que no tuvo diferencias significativas con M-130 °C -6. En los tratamientos G-150 °C-6, G-150 °C-9 y G-130 °C-9 los contenidos de carotenoides totales fueron respectivamente superiores en un 29 %, 13 % y 26 % respecto de los tratamientos en los que se utilizaron 20 % de maltodextrina. Estos porcentajes fueron atribuidos a que al incorporar 20 % de maltodextrina al cultivo de microalga para llevar a cabo el secado por atomización, este material de pared tuvo un efecto diluyente en el contenido de carotenoides totales; puesto que si se compara con la gelatina ésta fue incorporada en un 2 % en el medio de cultivo. Por lo tanto, los resultados se interpretaron que tanto la maltodextrina como la gelatina tuvieron aproximadamente el mismo efecto de protección en los carotenoides totales.

Se mencionó en la metodología que también se realizó el secado por atomización de la biomasa microalgal sin utilizar material de pared. Sin embargo, el proceso presentó muchas dificultades ya que la biomasa deshidratada se pegó tanto en el cilindro de pulverización como en el ciclón de separación. Únicamente a 150 °C y 9 mL/min se obtuvo escasa cantidad de biomasa deshidratada en el vaso de recolección, en los demás tratamientos en los que no se utilizó material de pared la biomasa deshidratada recolectada fue despreciable. En estas condiciones el contenido de carotenoides totales fue 49,48 ± 1,97 mg β-caroteno/gms y la humedad 26,85 ± 2,15 g/100 g. Si bien el contenido de carotenoides totales fue superior a los obtenidos con maltodextrina y gelatina se considera que es inviable la deshidratación sin la incorporación de material de pared por las dificultades tecnológicas y por el elevado contenido de humedad del producto obtenido.

Fenoles totales

Con referencia al estudio de fenoles totales las matrices de encapsulación fueron afectadas por la temperatura de entrada y por el caudal de la bomba, observándose diferencias significativas en las medias de estos componentes para todos los tratamientos estudiados.

Cuando se utilizó maltodextrina el rango de variación fue entre 7,23 y 16,87 mg EAG/gms. Estos componentes bioactivos a las dos temperaturas estudiadas se conservaron mejor cuando el caudal de alimentación fue 6 mL/min; mientras que, al igual para carotenoides totales, para un mismo caudal el contenido de fenoles totales fue superior a la temperatura de 130 °C (Tabla 2). Por lo tanto el mejor tratamiento fue M-130°C-6, con una concentración de fenoles totales de 16,87 ± 0,85 mg EAG/gms. La biomasa deshidratada tuvo un contenido de humedad de 6,85 ± 0,43 g/100 g.

Los fenoles totales variaron entre 0,88 y 8,13 mg EAG/gms cuando el material de pared fue gelatina. Estos componentes también se conservaron mejor a 130 °C. Sin embargo, el efecto del caudal de la bomba no fue el mismo para las temperaturas estudiadas; puesto que a 150 °C la mayor retención de fenoles totales se logró para un caudal de 9 mL/min y a 130 °C, para un caudal de 6 mL/min.

El tratamiento con gelatina con el que se obtuvo mayor concentración de compuestos fenólicos fue G-130 °C -6, logrando 8,13 ± 0,84 mg EAG/gms. El contenido de humedad de la biomasa deshidratada fue elevado, alcanzando el valor de 17,43 ± 0,80 g/100 g. Este contenido de humedad fue 2,5 veces superior al tratamiento con maltodextrina M-130°C-6 que posibilitó obtener la concentración más alta de fenoles totales en la biomasa microalgal deshidratada.

Si se comparan los materiales de pared para las mismas condiciones de temperatura y caudal, con 20 % de maltodextrina se consiguió mayor protección de los compuestos fenólicos que con 2 % de gelatina. Con este último material de pared, en el tratamiento G-150 °C –6 se logró conservar solo un 6% de los fenoles totales que se conservaron en M-150 °C –6, en G-150 °C –9 se conservaron 47 % de los fenoles logrados en M-150 °C –9, en G-130 °C –6, el 48 % respecto de M-130 °C –6 y en G-130 °C –9, el 31 % respecto de M-130 °C –9. Es decir, que aun incorporando una proporción de maltodextrina superior a la de gelatina, el contenido de fenoles totales fue superior; por lo que en este caso se interpretó que la maltodextrina tuvo un efecto protector superior al de la gelatina sobre los compuestos fenólicos

presentes en la biomasa de Scenedesmus obliquus.

En el secado por atomización de la biomasa microalgal sin material de pared llevado a cabo a 150 °C y 9 mL/min la concentración de fenoles totales fue 3,06 ± 0,17 mg EAG/gms, valor casi 6 veces más bajo que la concentración más alta de fenoles totales, alcanzada con el tratamiento M-130 °C-6; lo que confirma que la maltodextrina ejerció un efecto protector sobre estos componentes bioactivos.

De lo expuesto se puede señalar que en la concentración de compuestos fenólicos influyeron los 3 factores estudiados: el material de pared, el caudal de alimentación de la bomba y la temperatura del aire de secado. Estos resultados no son coincidentes con los obtenidos por Bonilla-Ahumada et al. (2018), quienes al estudiar la influencia del proceso de secado por aspersión de la microalga Tetraselmis chuii concluyeron que las variaciones de temperatura durante la microencapsulación no mostraron ningún efecto sobre la cantidad de compuestos fenólicos medidos como equivalente de ácido gálico.

Minerales

Se mencionó anteriormente que en los tratamientos donde no se utilizó material de pared el secado no fue posible, salvo para el tratamiento de temperatura de aire de ingreso al secadero de 150 °C y caudal de la bomba de 9 mL/min. En estas condiciones el contenido mineral fue superior al de los tratamientos en los que se utilizó material de pared (Tabla 3). Sin embargo, sin material de pared la cantidad de microalga deshidratada obtenida fue escasa ya que todo el polvo quedó adherido a las paredes del secadero. Adicionalmente, es importante señalar que los minerales pueden experimentar reacciones durante el almacenamiento que comprometen su biodisponibilidad (antiminerales o quelantes) y la estabilidad de los alimentos que los contienen. La encapsulación, mediante secado por aspersión, para desarrollar formulaciones en polvo pueden incrementar la vida útil de sales minerales durante el almacenamiento (Cardona-Tangarife et al., 2012).

Tabla 3. Contenido mineral en biomasa de microalga *Scenedesmus obliquus* deshidratada por atomización.

Tratamiento	Sodio mg/g_{ms}	Potasio mg/g_{ms}	Calcio mg/g_{ms}
M-130°C-6	11,52±0,27 [a]	5,53±0,03 [a]	0,71±0,06 [a]
M-130°C-9	11,16±0,13 [a]	5,27±0,01 [a]	0,59±0,01 [b]
M-150°C-6	11,90±0,03 [a]	5,82±0,02 [a]	0,80±0,01 [a]
M-150°C-9	11,63±0,10 [a]	5,45±0,03 a	0,42±0,04 [c]
G-130°C-6	45,39±0,71 [b]	12,04±0,11 [b]	3,31±0,11 [d]
G-130°C-9	45,32±0,64 [b]	12,09±0,08 [b]	3,14±0,02 [d]
G-150°C-6	45,99±0,27 [b]	12,45±0,10 [b]	3,30±0,09 [d]
G-150°C-9	47,81±0,26 [c]	11,92±0,05 [c]	3,11±0,05 [d]
150°C-6	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		
150°C-9	12,89±0,09 [d]	9,65±0,09 [d]	2,33±0,01 [e]
130°C-6	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		
130°C-9	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		
Tratamiento	**Magnesio mg/g_{ms}**	**Hierro mg/g_{ms}**	**Zinc $\times 10^{-3}$ mg/g_{ms}**
M-130°C-6	0,42±0,01 [a]	0,12±0,01 [a]	3,16±0,11 [ab]
M-130°C-9	0,38±0,01 [b]	0,13±0,01 [a]	2,81±0,09 [a]
M-150°C-6	0,44±0,01 [a]	0,13±0,01 [a]	2,94±0,13 [a]
M-150°C-9	0,44±0,04 [a]	0,14±0,01 [a]	3,27±0,12 [b]
G-130°C-6	1,73±0,01 [c]	0,49±0,03 [b]	5,64±0,08 [c]
G-130°C-9	1,67±0,02 [d]	0,49±0,01 [b]	5,71±0,08 [c]
G-150°C-6	1,79±0,15 [c]	0,47±0,03 [b]	5,02±0,17 [c]
G-150°C-9	1,67±0,12 [d]	0,53±0,01 [c]	6,09 ±0,06 [d]
150°C-6	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		
150°C-9	1,99±0,01 [e]	1,51±0,01 [d]	33,52±0,27 [e]
130°C-6	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		
130°C-9	Sin material de pared, en estas condiciones no fue posible el secado.		

Cuando se utilizó maltodextrina como material de pared el contenido mineral fue inferior que cuando se trabajó con gelatina, pero al igual que para carotenoides totales, esto fue atribuido al efecto diluyente de la maltodextrina al adicionarla en un 20 % en el cultivo microalgal. Adicionalmente, en términos generales se puede observar en la Tabla 3 que para un mismo material de pared el contenido de cada mineral fue sin diferencias significativas, o bien, hubo pequeñas variaciones; por lo que la temperatura del aire al ingreso del secadero y el caudal de alimentación de la bomba no fueron factores determinantes en el contenido mineral.

Los contenidos de sodio en las microalgas correspondientes a los tratamientos con maltodextrina, a la microalga secada por aspersión sin material de pared y a la microalga liofilizada fueron comparables. Sin embargo, en el secado por atomización con gelatina como material de pared este mineral fue 4 veces superior debido a la presencia en la gelatina de 4,6 mg de sodio /g.

Tomando como referencia la biomasa microalgal liofilizada en discos de 2 cm de diámetro y 5 mm de espesor, la retención de potasio en la biomasa deshidratada utilizando maltodextrina fue 57 %, de calcio, 21 %; magnesio, 22 %; hierro y 16 %; zinc. La retención de minerales con el material de pared gelatina fue 57 % de potasio, 100 % de calcio, 92 % de magnesio, 62 % de hierro y 14 % de zinc. El potasio en la biomasa encapsulada con gelatina fue 1,25 veces mayor que el material liofilizado, lo que fue atribuido a que la gelatina contiene 1 mg/g de este mineral.

4. Conclusiones

Las tecnologías de secado estudiadas para la deshidratación de cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus* influyeron en el contenido de humedad, componentes bioactivos y minerales presentes en la microalga deshidratada. La concentración de los analitos de interés en la liofilización varió según el espesor de los discos de biomasa deshidratada, logrando la mayor retención de compuestos carotenoides y fenólicos para espesores de 5 mm; mientras que este último factor no influyó en el contenido mineral. Referido al secado por atomización influyeron los 3 factores experimentales estudiados: material de pared, temperatura de ingreso de aire al secadero y caudal de alimentación. El tratamiento que posibilitó obtener biomasa microalgal deshidratada de baja humedad y mayor concentración de componentes bioactivos fue con material de pared maltodextrina, temperatura de ingreso de aire de 130 °C y caudal de alimentación de 6 mL/min. En cuanto a los minerales, la temperatura del aire y el caudal de alimentación de la bomba no fueron factores determinantes en la concentración. Sin embargo, influyó el material de pared. Cuando se utilizó gelatina se consiguió una mayor retención de los minerales. De lo expuesto se concluye que si bien con la tecnología de liofilización se alcanzaron mayores concentraciones de los componentes de interés, ambas metodologías pueden considerarse para la deshidratación de microalgas, ya que en términos generales la menor concentración alcanzada con el secado por atomización se debió al efecto diluyente que provoca la incorporación de maltodextrina en el cultivo microalgal.

5. Referencias

Bonilla-Ahumada, F.J.; Khandual S.; Lug-Cervantes E.C. (2018). *Microencapsulation of algal biomass (Tetraselmis chuii) by spray-drying using different encapsulation materials for better preservation of betacarotene and antioxidant compounds,* Algal Research, 36, 229-238.

Campelo P, Sanches E, De Barros-Fernandes R, Botrel D, Borges S. (2018). *Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends.* Food Research International, 105: 936-944.

Cardona-Tangarife D.P.; Patiño-Arias L.P.; Ormaza-Zapata. (2021). *Aspectos tecnológicos de la microencapsulación de compuestos bioactivos en alimentos mediante secado por aspersión*, Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 22(1): 1-21.

Copia J., Gaete H., Zúñiga G., Hidalgo M., Cabrera E. (2012). *Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina Chlorella sp*., Latin American Journal of Aquatic Research, 40(1): 113-123.

Cortés-Rojas D.; Fernandes C., Oliveira W. (2015). *Optimization of spray drying conditions for production of Bidens pilosa L. dried extract*. Chemical Engineering Research and Design, 93, 366-376.

Costa B.R.; Rodriguez M.C.K.; Rocha S.F., Pohndorf R.S.; Larrosa A.P.Q.; Pinto L.A.A. (2016). *Optimization of Spirulina sp. Drying in Heat Pump: Effects on the Physicochemical Properties and Color Parameter*, J. Food Process. Preserv. 40: 934-942.

Dammak, M.; Hadrich, B.; Barkallah, M.; Hentati, F.; Ben Hlima, H.; Pichon, C.; Denis, M.; Fendri, I.; Michaud, P.; Abdelkafi, S. (2018). *Modelling Tetraselmis sp. growth-kinetics and optimizing bioactive-compound production through environmental conditions*, Bioresour Technol 249, 510-518.

De Marchin T, Erpicum M, Franck F. (2015). *Photosynthesis of Scenedesmus obliquus in outdoor open thin-layer cascade system in high and low CO_2 in Belgium*. Journal of Biotechnology, 215: 2–12

Desai K.G.H.; Park H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of *food ingredients*, Drying Technology 23, 1361–1394.

Jimenez-Veuthey, M.; Vidal, N.M.; Cabrera, C.; Paramo, J.; Bertoni, M.; Bordet H.F.; Andrade-Belgeri, M.S.; Flores, M.L.; Zapata, L.M. (2018). *A simple, efficient and economical method for isolation of Scenedesmus obliquus (Chlorophyceae) from freshwater sample (Embalse Salto Grande, Argentina)*. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences 20, 6-12.

Lira, G.M.; López, A.M.Q.; Firmino, G.O.; Santos, S.D.; Bezerra, R.D.S. (2017). *Total carotenoids and antioxidant activity of fillets and shells (in natura or cooked) of "Vila Franca" shrimp (Litopenaeus Schmitti) in different intervals of storage under .freezing,* Ciência e Agrotecnologia 41, 94-103.

Normas APHA- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 3111.

Plaza del Moral M. (2010). *Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas.* Tesis doctoral. Universidad Autonoma de Madrid.

Quevedo, C.; Morales, S. P.; Acosta, A. (2008). *Crecimiento de Scenedesmus sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal,* Vitae 15(1), 25-31.

Sagar V.R., Suresh-Kumar P. (2010). *Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review*. J Food Sci Technol, 47(1): 15–26.

Silva N.C.; Machado M.V.C.; Brandão R.J.; Duarte C.R.; Barrozo M.A.S. (2019). *Dehydration of microalgae Spirulina platensis in a rotary drum with inert bed,* Powder Technology, 351: 78-185.

Tramontin DP, Gressler PD, Rörig LR, Derner RB, Pereira-Filho J, Radetski CM, Quadri MB. (2018). *Growth modeling of the green microalga Scenedesmus obliquus in a hybrid photobioreactor as a practical tool to understand both physical and biochemical phenomena in play during algae cultivation*. Biotechnology and Bioengineering, 115(4): 965–977.

Zia M.P., Alibas I. (2021). *Influence of the drying methods on color, vitamin C, anthocyanin, phenolic compounds, antioxidant activity, and in vitro bioaccessibility of blueberry fruits*. Food Bioscience, 42.

13TCA - Evaluación del crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en diferentes cultivos para su utilización como bioinsumo agrícola.

Growth evaluation of *Scenedesmus obliquus* microalgae in different cultures for its use as agricultural bio-input.

Cecilia Cabrera[1], Evelin Carlier[1], Gianella Itatí Dalzotto[1], Sofía Carla Aumenta[1], Tomás Russo[1], Natalia Sacks[1], Fiama Ayelen Schiebert[1], Luz Marina Zapata[1].

1. Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos. Avenida Monseñor Tavella 1450, 3200, Concordia, Argentina. cecilia.cabrera@uner.edu.ar

Resumen

Se estudió el crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en diferentes medios de cultivo, analizando la composición nutricional y poder evaluar su potencial uso como bioinsumo en cultivo de hortalizas. Se trabajó con dos medios de cultivo A&A y BG1, suplementado con fuentes de NO_3^- y carbono. La fuente de carbono, CO_2, se incorporó a demanda controlando el pH del medio en 8,0±0,1. Se emplearon biorreactores colocados en cámara de cultivo a 25±1ºC, fotoperíodo y agitación constante por burbujeo de aire. Periódicamente se determinó densidad celular, biomasa microalgal, composición mineral, fenoles y carotenoides totales. El medio en el cual se alcanzó una mayor producción de biomasa microalgal fue en A&A con NO_3^- y CO_2. El crecimiento microalgal a mayor escala se describió por los modelos de Gompertz, von Bertalanffy y Logístico. Este último fue el que mejor explicó los datos experimentales. El cultivo microalgal presentan altas concentraciones de nutrientes y componenetes bioactivos. Los resultados indican que el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en A&A con NO_3^- y CO_2 constituye una fuente adecuada de nutrientes y metabolitos secundarios con potencialidad para ser utilizado como bioinsumo en cultivo de hortalizas, siendo una alternativa al uso de productos químicos sintéticos.

Palabras clave: composición nutricional, bioinsumo agrícola.

Abstract

Scenedesmus obliquus microalga was studied while cultivated in different culture mediums. It was analyzed its nutritional composition and its potential to be used as bio-input in vegetable cultures. Two culture mediums were utilized: Allen&Arnon and BG1, both supplemented with NO_3^- and carbon sources. The carbon source, CO_2, was incorporated as required in order to maintain the pH in 8,0±0,1. Bioreactors in a culture chamber were used at 25±1ºC, photoperiod and constant agitation by bubbling air were employed. Cell density, microalgal biomass, mineral composition, phenols and total carotenoids were determined periodically. The major microalgal biomass was reached using Allen&Arnon con NO_3^- and CO_2. The microalgal growth was described by Gompertz, von Bertalanffy y Logistico´s models, being Logistico´s model the best explaining the experimental results. Microalgal culture presented high concentrations of nutrient and bioactive components. Microalga *Scenedesmus obliquus* culture, cultivated in Allen&Arnon with NO_3^- and CO_2, is a suitable source of nutrients and secondary metabolites. Consequently, it could be utilized as bio-input in vegetable cultures, being alternative to the use of synthetic chemical products.

Keywords: *Scenedesmus obliquus*, nutritional composition, agricultural bio-input.

1. Introducción

En las próximas décadas, una problemática crucial será satisfacer las demandas de alimentos sin causar una mayor degradación ambiental (Odegard y van der Voet, 2014). A su vez, la expansión de la población mundial representa una presión adicional sobre los recursos de la tierra (Povero et al., 2016). De esta manera, la sociedad enfrenta el desafío de aumentar la producción agrícola en medio del cambio climático global, así como desarrollar tecnologías innovadoras que aumenten los rendimientos agrícolas, minimicen los insumos y disminuyan la contaminación ambiental (Povero et al., 2016; García-Gonzalez y Sommerfeld, 2016).

Al mismo tiempo, el uso excesivo de agroquímicos sintéticos ha dado lugar a una degradación ecológica en todo el mundo, lo que lleva a la eutrofización, infertilidad del suelo y pérdida de biodiversidad (Chagnon et al., 2015). Asimismo, la producción de gases de efecto invernadero, la acidificación y el aumento de contaminación del suelo y el agua son algunos de los efectos negativos producidos por el uso excesivo de insumos químicos (Köhler y Triebskorn, 2013; Barone et al., 2018).

De esta manera, la creciente necesidad de productos no tóxicos y amigables con el medio ambiente se ha traducido en la búsqueda acelerada de compuestos naturales como bioinsumo agrícola. En tal sentido, es posible considerar a las algas como un recurso prometedor, pudiendo ser utilizadas como biofertilizantes o bioestimulantes agrícolas (Michalak y Chojnacka, 2014).

En los últimos años, el interés en el uso de microalgas ha aumentado debido a su versatilidad y potencial aplicación en muchos sectores diferentes (Barone et al., 2018). Las microalgas han sido propuestas para eliminar contaminantes tóxicos del agua (Baglieri et al., 2016), depurar aguas residuales (García-Gozalbes et al., 2015), producir biomasa (Andrade et al., 2009) y biocombustibles (Brennan y Owende, 2010). Se han utilizado como fuente de alimento para animales (Borowitzka, 2013) y para la obtención de compuestos bioactivos (Encarnação et al. 2015). En este sentido, a partir de estos microorganismos, es posible producir compuestos de interés químico-farmacéutico, como bactericidas y fungicidas (Pagnussatt et al., 2013), además de presentar efectos estimulantes en el crecimiento de las plantas (García-Gonzalez y Sommerfeld, 2016; Nabti, 2017). Por lo cual, pueden ser utilizados como alternativas a los tratamientos con plaguicidas y fertilizantes en cultivos intensivos.

Muchos productos a base de microalgas están disponibles para su uso en la agricultura como fuente de nutrientes para los cultivos (Vigani et al., 2015). Los extractos de microalgas contienen nutrientes, especialmente nitrógeno, fósforo y potasio y se consideran un fertilizante orgánico de liberación lenta (Coppens et al., 2016). Asimismo, estos microorganismos son una fuente de antioxidantes, hormonas de crecimiento de plantas, osmoprotectores, minerales y muchos otros compuestos orgánicos, incluidas moléculas bioactivas (Pacholczak et al., 2016). La aplicación de extracto de microalgas mejora el desarrollo de las plantas, aumenta la producción de cultivos y preserva las plantas del estrés abiótico y biótico (García-Gonzalez y Sommerfeld, 2016; Barone et al., 2018).

Se han estudiado para estos fines microalgas que pertenecen al género *Scenedesmus* (Pagnussatt et al., 2013). *Scenedesmus sp.* crece en aguas dulces ricas en nutrientes, presentando resistencia a la contaminación (Andrade et al., 2009). Este género se encuentra en el Embalse de Salto Grande, un lago artificial de 780 km2, ubicado aguas arriba de la Represa de Salto Grande, a 18 km de Concordia (Entre Ríos-Argentina) (Bordet et al., 2012), siendo una microalga autóctona con potenciales usos biotecnológicos (Wiltshire, 2000). Con el fin de reducir los impactos ambientales adversos provocados por productos químicos sintéticos utilizados en el cultivo extensivo de hortalizas, la utilización de una microalga autóctona como *Scenedesmus obliquus* constituye una alternativa viable para reducir el uso de estos productos.

El objetivo de nuestra investigación fue estudiar modelos cinéticos de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en diferentes medios de cultivo, analizando la composición de nutrientes minerales y componentes bioactivos para evaluar su potencial utilización como bioinsumo agrícola.

2. Materiales y métodos

2.1. Cultivo de Microalgas

La microalga utilizada en este estudio es *Scenedesmus obliquus*, aislada de Embalse Salto Grande (Argentina), ubicada en 30° 59’ 19,07” de latitud sur y 57° 54’ 19,24” de latitud oeste (Jiménez-Veuthey et al., 2018).

Se trabajó con dos medios de cultivo estándar: Allen & Arnon (Arnon *et al.* 1974) y BG1 (Allen, 1968), suplementado con fuentes de nitrato y carbono. Para los tratamiento con nitrato (NO_3^-),

se suplementó el medio de cultivo Allen & Arnon (A&A) con 0,21 g/L de nitrato de sodio (NO_3Na) y 0,25 g/L de nitrato de potasio (NO_3K). Mientras que en el medio BG11, se incorporó 1,5 g/L de NO_3Na. Para los tratamientos con incorporación de carbono, se utilizó dióxido de carbono (CO_2), en ambos medios de cultivo, fue suministrado a demanda para mantener controlado el pH del medio en 8,0±0,1.

Los experimentos se llevaron a cabo en fotobiorreactores de 300 mL colocados en cámara de cultivo a 25±1ºC, 65% HR, fotoperíodo luz/oscuridad 12/12 y agitación 0,2 v/v/min durante 15 días. Se evaluaron ocho tratamientos con tres repeticiones cada uno. Para el medio de cultivo A&A: A&A sNO_3- sCO_2 (sin incorporación de fuentes de NO_3^- y CO_2), A&A sNO_3- cCO_2 (sin incorporación de NO_3^- y con CO_2), A&A cNO_3- sCO_2 (con incorporación de NO_3^- y sin CO_2), A&A cNO_3- cCO_2 (con incorporación de NO_3^- y CO_2). En el medio de cultivo BG11: BG11 sNO_3- sCO_2 (sin incorporación de fuentes de NO_3^- y CO_2), BG11 sNO_3- cCO_2 (sin incorporación de NO_3^- y con CO_2), BG11 cNO_3- sCO_2 (con incorporación de NO_3^- y sin CO_2), BG11 cNO_3- cCO_2 (con incorporación de NO_3^- y CO_2).

Una vez seleccionado el mejor tratamiento, se probó la producción a mayor escala con la finalidad de obtener mayor cantidad de biomasa microalgal. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo en biorreactores de 25 L colocados en cámara de cultivo a 25±1ºC, 55-60 % HR, fotoperíodo luz/oscuridad 16/8 h, modificando la irradiancia en las horas de luz según se señala a continuación: 8,75 µmol/(m^2 s) – 2 h; 17,50 µmol/(m^2 s) – 3 h; 26,25 µmol/(m^2 s) – 6 h; 17,50 µmol/(m^2 s) – 3 h, 8,75 µmol/(m^2 s) – 2 h.

Para mantener el cultivo de manera homogénea se colocó aireación continua en cada fotobiorreactor utilizando un compresor (GAST, 3HBE-31T-M303X) cuya función fue enviar aire a través de tubería de 4 mm de diámetro interior y 6 mm de diámetro exterior conectada a una válvula de 6 mm. La inyección de aire fue de 0,78 Laire/(min Lcultivo).

Para evaluar el crecimiento del cultivo de microalgas se cuantificaron la densidad de población celular y la biomasa. Además, se realizó un seguimiento de la composición mineral, compuestos fenólicos y carotenoides del cultivo de microalgas conforme el mismo fue creciendo. Para ello, periódicamente se tomaron muestras del medio de cultivo.

2.2. Técnicas analíticas

Densidad de población celular. El crecimiento de las microalgas en los biorreactores fue monitoreado periódicamente contando el número de células en cámara de Neubauer en microscopio de luz invertida (Leica, DMIL) (Castro et al. 2008). Los resultados se expresaron en N° de células/mL.

Biomasa producida. Se llevó a cabo el secado de biomasa, hasta lograr un peso constante (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007), en horno de secado Raypa. Los resultados se expresaron en g/L.

Rendimiento de los cultivos expresada en (%). Se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación: Rendimiento (%) = (concentración de la biomasa final) / (concentración de la biomasa inicial) x100.

Composición mineral. Se evaluaron los minerales: sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), Boro (B), Manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn) y Fósforo total (P). También se cuantificaron los metales plomo (Pb) y cromo (Cr). Para ello se realizó la digestión de las muestras por microondas (Multiwave PRO, Anton ©) con ácido nítrico y se llevó a cabo la cuantificación de los minerales por Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma por Microondas (Standard Methods, 2012). Los resultados se expresaron en mg/L.

Carbono total (C) y nitrógeno total (N). Se determinaron por método de combustión (Método Dumas) en analizador CHN 628 LECO. Los resultados se expresaron en mg/L.

Carotenoides totales (CT). Se cuantificaron por método espectrofotométrico usando espectrofotómetro UV-Vis (Hach, DR-600) a 450 nm (Lira et al., 2017; Arredondo-Vega et al., 2007). La curva de calibrado se construyó utilizando β-caroteno como estándar de referencia. Los resultados se expresaron en mg β-caroteno/gms (ms: materia seca).

Fenoles totales (FT). Se analizaron utilizando la metodología de reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Copia et al., 2012). Este reactivo es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolíbdico en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos de la muestra originando óxidos azules de wolframio (W8O23) y molibdeno (Mo8O23). Se midió la absorbancia del color azul desarrollado a 760 nm en espectrofotómetro (HACH, DR-6000). La curva de calibrado se construyó con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/gms.

2.3. Modelos de crecimiento microalgal

La microbiología predictiva, basada en el crecimiento microbiano, ha desarrollado modelos matemáticos para describir y predecir el comportamiento de estos microorganismos bajo diferentes condiciones (Castro et al., 2008).

En la presente investigación, se obtuvo inicialmente la variación de la densidad celular de cultivo de *Scenedesmus obliquus* en función del tiempo de cultivo durante 30 días. A continuación, las curvas de crecimiento fueron descriptas por los modelos de crecimiento: Gompertz (Castro et al. 2008, Vásquez-Villalobos et al. 2013), Logístico (Castro et al. 2008, Vásquez-Villalobos et al. 2013, Cayré et al. 2007) y von Bertalanffy (Koya y Goshu 2013); cuyas expresiones matemáticas se muestran en las ecuaciones (1), (2) y (3) respectivamente.

$$N_t = N_0 + D\, e^{\{-e^{[-B(t-M)]}\}} \quad (1)$$

$$N_t = N_0 + \frac{D}{1+e^{-B(t-M)}} \quad (2)$$

$$N_t = N_0 + D\left\{1 - B\, e^{[-k(t-\mu)]}\right\}^3 \quad (3)$$

Dónde:

N_t: Densidad de población celular al tiempo t (células/mL)

N_0: Densidad de población celular inicial, al momento de la inoculación (células/mL)

t: Tiempo de cultivo (día)

μ: Velocidad de crecimiento específica (1/día)

e = 2,7182

D: Logaritmo de la diferencia entre la densidad de población máxima y la densidad de población inicial (células/mL)

B: Velocidad de crecimiento, está representada por la pendiente de la curva [(células/mL)/día]

M: Tiempo en el cual la velocidad de crecimiento es de mayor magnitud

k: Tasa máxima de crecimiento absoluto.

La velocidad específica de crecimiento celular máxima, se obtuvo tomando la pendiente de la recta tangente en el punto de inflexión de la curva de crecimiento cuando la microalga tuvo un crecimiento exponencial. El tiempo de latencia, λ (día), se calculó mediante la intersección de la línea tangente antes mencionada en el eje de abscisas. Con el valor de la asíntota, D, [D=ln (N_{max}/N_0)] leída en el eje de ordenadas, se obtuvo la densidad de población celular máxima (Nmax, células/mL) (Zwietering et al. 1990). El tiempo de duplicación (TD) fue calculado como Ln(2)/μmax (Quevedo et al. 2008).

2.4. Validación de modelos

Para la determinación de la capacidad predictiva de los modelos de Gompertz, Logístico y de von Bertalanffy se utilizó el software MATLAB (Matlab R2014a v. 8.3.0.532). Para contrastar los modelos con los datos experimentales se utilizaron los siguientes 3 parámetros: coeficiente de determinación (R^2), suma de cuadrado del error (SSE) y error cuadrado medio (RMSE) (Dammak et al. 2018).

3. Resultados y Discusión

3.1. Cultivo de Microalgas

Periódicamente se evaluó el crecimiento de las microalgas *Scenedesmus obliquus* (Figura 1). La densidad celular inicial fue de 4,65 × 10^5 células/mL en medio de cultivo Allen & Arnon con incorporación de fuentes de NO_3^- y de 6,00 × 10^5 células/mL en el cultivo con medio Allen & Arnon sin incorporación de fuentes de NO_3^-.

Mientras que la densidad celular inicial fue de 3,08 × 10^5 células/mL en medio de cultivo BG11 con incorporación de fuentes de NO_3^- y de 3,25 × 10^5 células/mL en el cultivo con medio BG11 sin incorporación de fuentes de NO_3^-.

Figura 1. Vista al microscopio de cultivo de microalgas *Scenedesmus obliquus.*

El tiempo de cultivo total fue de 15 días. En la Figura 2 se muestran los resultados de las curvas de crecimiento para los 8 tratamientos del medio A&A y BG11, en la que se puede observar claramente que hubo diferencias en el desarrollo microalgal.

Para el medio de cultivo A&A el tratamiento sin incorporación de fuentes de nitratos y dióxido de carbono (A&A sNO_3-sCO_2), alcanzó la máxima densidad celular de $1,89 \times 10^6$ células/mL en el día 13 de cultivo; el tratamiento sin incorporación de fuentes de nitratos y con incorporación de dióxido de carbono a demanda (A&A sNO_3-cCO_2), alcanzó la máxima densidad celular de $2,86 \times 10^6$ células/mL en el día 8 de cultivo.

Por su parte, en los tratamientos donde se incorporó fuentes de nitrato se pudo observar mayor densidad celular. El tratamiento sin incorporación de dióxido de carbono (A&A cNO_3-sCO_2), alcanzó la máxima densidad celular de $1,30 \times 10^7$ células/mL en el día 13 de cultivo y el tratamiento con nitratos y dióxido de carbono (A&A cNO_3-cCO_2), presentó la máxima densidad celular de $1,42 \times 10^8$ células/mL en el día 13 de cultivo.

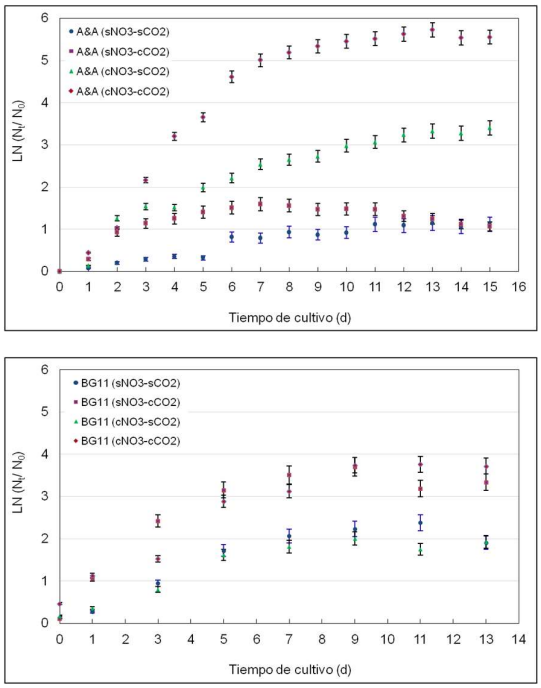


Figura 2. Curva de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* en medio de cultivo estándar Allen & Arnon (arriba) y BG11 (abajo) para cada tratamiento (con y sin agregado de fuentes de nitrato y dióxido de carbono).

Para el medio de cultivo BG11, el tratamiento sin incorporación de fuentes de nitratos y dióxido de carbono (BG11 sNO_3-sCO_2), alcanzó la máxima densidad celular de $3,52 \times 10^6$ células/mL en el día 13 de cultivo; el tratamiento sin incorporación de fuentes de nitratos y con incorporación de dióxido de carbono a demanda (BG11 sNO_3-cCO_2), alcanzó la máxima densidad celular de $1,32 \times 10^7$ células/mL en el día 11 de cultivo.

El tratamiento con incorporación de fuente de nitrato y sin dióxido de carbono (BG11 cNO_3-sCO_2), alcanzó la máxima densidad celular de $2,30 \times 10^6$ células/mL en el día 11 de cultivo y el tratamiento con nitratos y dióxido de carbono (BG11 cNO_3-cCO_2), presentó la máxima densidad celular de $1,33 \times 10^7$ células/mL en el día 13 de cultivo.

En cuanto a la producción de biomasa se puede señalar que, al final de la fase exponencial el contenido de biomasa fue mayor para el tratamiento A&A cNO_3-cCO_2 (Tabla 1), coincidiendo con los valores de densidad celular obtenida. En la Tabla 1, también se puede observar que el rendimiento de la biomasa producida en el tratamiento A&A sNO_3- cCO_2 fue 3 veces superior al tratamiento A&A sNO_3- sCO_2; que el rendimiento en A&A cNO_3- sCO_2 fue 6 veces superior y en A&A cNO_3- cCO_2 56 veces más alto que el tratamiento A&A sNO_3- sCO_2.

En el medio BG11, el contenido de biomasa fue mayor para el tratamiento BG11 cNO_3-cCO_2, coincidiendo con los valores de densidad celular obtenida. En la Tabla 1, se puede observar que el rendimiento de la biomasa producida en el tratamiento BG11 cNO_3- cCO_2 fue 2 veces superior al tratamiento BG11 cNO_3- sCO_2 que presentó el menor rendimiento de todos los tratamientos del medio BG11. Además el rendimiento de la biomasa producida en el tratamiento A&A cNO_3- cCO_2 fue 20 veces superior al mejor tratamiento del medio de cultivo BG11 (BG11 cNO_3- cCO_2).

Tabla 1. Determinaciones de Biomasa (g/L) y Rendimiento (%) para cada tratamiento de cultivo en medios Allen & Arnon y BG11.

Tratamientos	Biomasa (g/L)	Rendimiento (%)
A&A sNO_3-sCO_2	0,07±0,01a	98,28±9,87 a
A&A sNO_3^- cCO_2	0,22±0,09 a	289,47±15,68 a
A&A cNO_3^- sCO_2	0,46±0,03 a	610,53±44,65 a
A&A cNO_3^- cCO_2	4,15±0,29 b	5461,84±381,47 b
BG11 sNO_3^- sCO_2	0,30±0,02 a	202,74±11,62 b
BG11 sNO_3^-	0,37±0,03 b	255,48±22,28 c

cCO_2		
BG11 cNO_3^- sCO_2	0,30±0,02 a	126,47±8,91 a
BG11 cNO_3^- cCO_2	0,64±0,01 c	271,01±2,97 c

Quevedo et al. (2008) para cultivos de *Scenedesmus sp.* obtuvieron contenidos de biomasa entre 0,195 y 0,408 g/L, dependiendo del medio de cultivo utilizado.

También en una investigación realizada por Ji et al. (2015) se estudió el efecto de aguas residuales de alimentos sobre la producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus* cultivada en medio basal de Bold (BBM), alcanzando un contenido de biomasa de 0,41 g/L después de 6 días de cultivo.

Si bien, el contenido de biomasa máxima en la mayoría de los tratamientos ensayados en este estudio es comparable con valores obtenidos por otros investigadores, el tratamiento A&A cNO_3- cCO_2 superó ampliamente dicha producción microalgal.

Posteriormente se seleccionó para el escalado en bioreactores de 25 L, el medio de cultivo que permitió una mayor producción de biomasa microalgal, es decir, el medio de cultivo Allen & Arnon con la incorporación de fuentes de nitrato y dióxido de carbono (A&A cNO_3^- cCO_2). Los experimentos se llevaron a cabo bajo las condiciones mencionadas en la metodología.

Periódicamente se evaluó el crecimiento de las microalgas *Scenedesmus obliquus* mediante recuento celular. El recuento celular inicial fue $9{,}5\times10^4$ células/mL, se observó una fase de latencia, una fase exponencial hasta el día 26, alcanzando una densidad celular de $1{,}85\times10^7$ células/mL (Figura 3).

Entre los días 26 y 30 la densidad celular disminuyó notablemente, por lo que al tiempo de cultivo de 30 d se dio por finalizado el ensayo. Puede observarse en la figura que el cultivo no mostró una fase estacionaria claramente marcada.

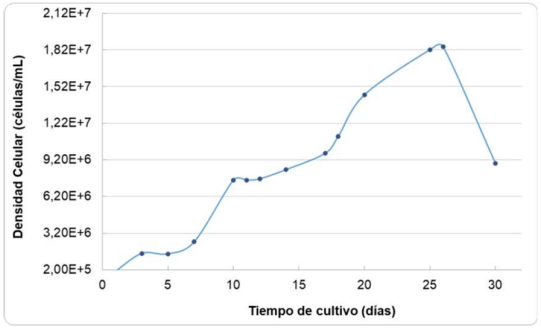


Figura 3. Evolución de la densidad celular en función del tiempo de cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor de 25 L.

Como era de esperar, la biomasa producida en función del tiempo de cultivo tuvo un comportamiento muy similar al de la evolución de la densidad celular (Figura 4). La biomasa máxima producida al final de la fase exponencial fue de 0,4 g/L, lo que representó un rendimiento del 38% (Figura 4).

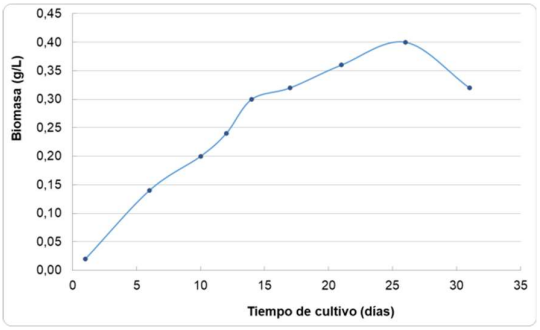


Figura 4. Evolución de la biomasa celular de la microalga *Scenedesmus obliquus*, en función del tiempo de cultivo en fotobiorreactor de 25 L.

Dichos valores son comparables con los datos obtenidos en las mejores condiciones de los diferentes medios y la bibliografía existente. Si bien, la densidad celular no alcanza el máximo obtenido a escala laboratorio para el tratamiento A&A cNO_3- cCO_2 correspondiente a $1{,}42\times10^8$ células/mL.

3.2. Modelos de crecimiento microalgal

En la Figura 5 se muestran los modelos de Gompertz, Logístico y de von Bertalanffy ajustados a los resultados de crecimiento experimental de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

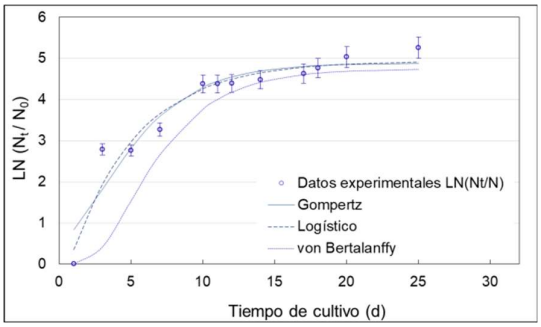


Figura 5. Curva de crecimiento experimental de *Scenedesmus obliquus* y modelos de Gompertz, Logístico y de von Bertalanffy.

Los parámetros estadísticos de bondad de ajuste señalan que el modelo de Logístico fue el que

mejor describió los resultados experimentales (mayor R^2 y valores más bajos de SSE y RMSE). No obstante, los modelos Gompertz y de von Bertalanffy también describieron satisfactoriamente dichos resultados (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento y de bondad de ajuste para los modelos estudiados.

Modelos	Gompertz	Logístico	Von Bertalanffy
Parámetros cinéticos			
μmáx (1/d)	1,12	1,31	1,35
λ (d)	0,3	0,3	1
D	4,883	4,939	4,744
Nmáx (cél/mL)	1,25×107	1,33×107	1,09×107
TD (d)	0,62	0,53	0,51
Parámetros de bondad de ajuste			
R^2	0,9106	0,9399	0,9270
SSE	2,299	1,546	1,878
RMSE	0,4572	0,3749	0,4334

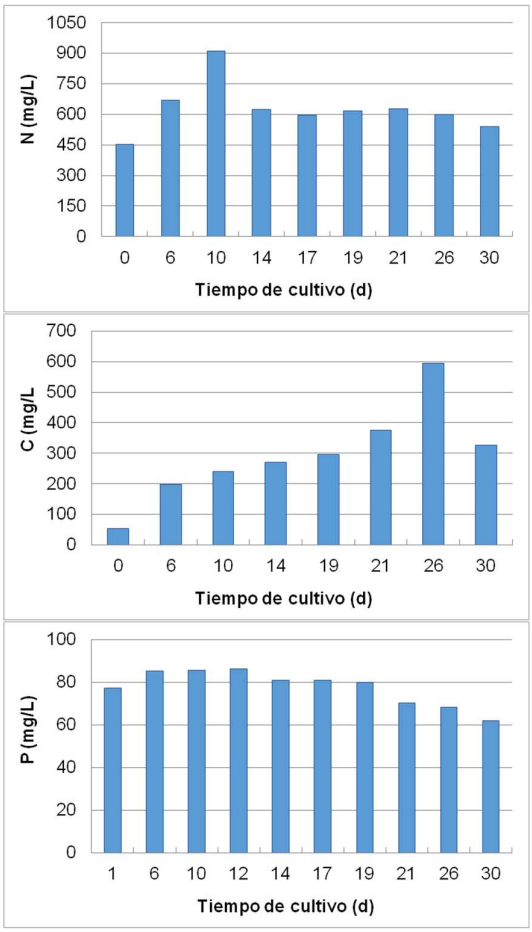
Según el modelo Logístico la velocidad máxima de crecimiento fue de 1,31/d, el tiempo de latencia de 0,3 d; el tiempo de duplicación de 0,53 d y la densidad celular máxima alcanzada $1{,}33\times10^7$ células/mL.

En la literatura se encontraron para cultivos de *Scenedesmus sp* valores de μmáx = 0,27/d (Aburai et al., 2015); cuatro veces inferior a la velocidad máxima de crecimiento obtenida en el presente tratamiento. Además, se encontraron valores de tiempo de latencia de 1 d (Dammak et al., 2018) y de 4 d (Quevedo et al., 2018), inferiores a nuestros resultados según el modelo Logístico.

Estos resultados estarían indicando la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en el medio Allen & Arnon suplementado con $NaNO_3$ y KNO_3 tuvo una muy buena adaptación y crecimiento en el medio de cultivo en las condiciones ambientales señaladas en la metodología; con una fase de latencia más breve y mayor velocidad máxima de crecimiento.

3.3. Composición mineral

El contenido de nitrógeno y carbono en fotobiorreactores de 25L inicialmente aumentaron su concentración hasta alcanzar el valor máximo a los 10 y 21 d de tiempo de cultivo, respectivamente (Figura 6). Estos resultados explican que a medida que transcurrió el tiempo se fue incrementando la concentración de biomasa microalgal y la microalga fue consumiendo nitrógeno; mientras que el incremento de la biomasa fue acompañado por un aumento en la concentración de carbono. Los valores máximos alcanzados en nitrógeno y carbono fueron 910,60±51,83 mg/L y 595,55±34,15 mg/L; respectivamente.



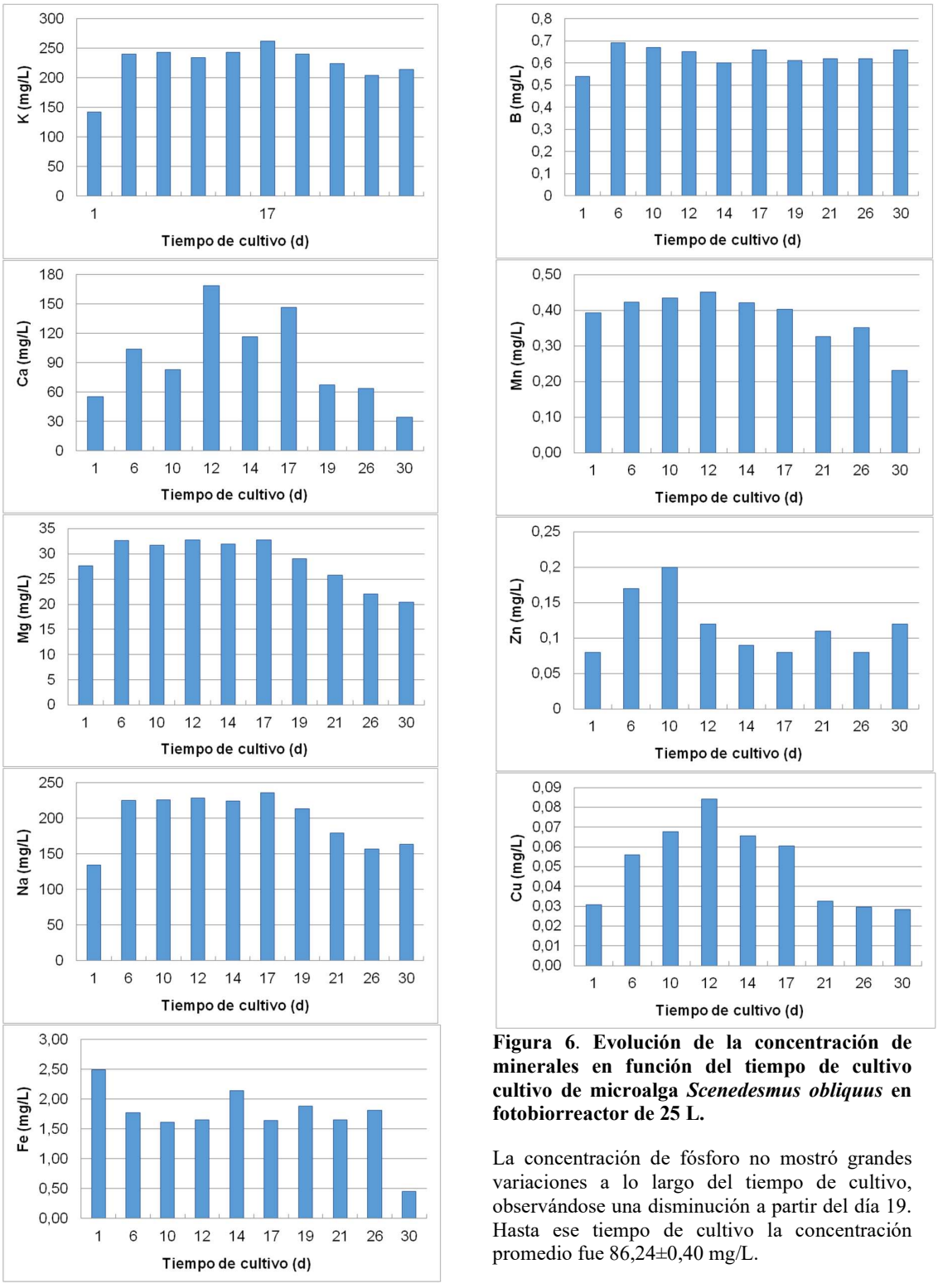


Figura 6. Evolución de la concentración de minerales en función del tiempo de cultivo cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor de 25 L.

La concentración de fósforo no mostró grandes variaciones a lo largo del tiempo de cultivo, observándose una disminución a partir del día 19. Hasta ese tiempo de cultivo la concentración promedio fue 86,24±0,40 mg/L.

Los macronutrientes K, Ca y Mg aumentaron sus concentraciones en los primeros días de cultivo para alcanzar las concentraciones más elevadas entre los días 6-17, 12-17 y 6-17; respectivamente. Los valores máximos fueron para K 262,38±1,91 mg/L; Ca 168,71±2,81 mg/L y Mg 32,78±0,49 mg/L.

El Na también tuvo un comportamiento similar y la concentración más elevada fue 236,10±1,18 mg/L.

Referido a los micronutrientes, el Fe tuvo su máxima concentración (2,15±0,02 mg/L) al inicio del cultivo, luego fue disminuyendo hasta el día 12 y posteriormente se mantuvo entre 1,65 y 2,15 mg/L hasta el día 26, tiempo a partir del cual la concentración de Fe disminuyó.

El B incrementó su concentración los primeros 5 días de cultivo hasta 0,70±0,01 mg/L, luego se mantuvo entre 0,6 y 0,7 mg/L hasta la finalización de los ensayos.

El Mn, si bien alcanzó su máxima concentración de 0,45±0,00 mg/L al día 12, éste no mostró grandes variaciones hasta el día 17 donde a partir de este tiempo de cultivo se observó una disminución de la concentración.

Los micronutrientes Zn y Cu incrementaron su concentración hasta los días 10 y 12, respectivamente; alcanzando el máximo de 0,20±0,02 mg/L para el Zn y 0,08±0,00 mg/L para el Cu; posteriormente la concentración de ambos minerales disminuyó.

En la Tabla 3 se muestran los valores máximos obtenidos para cada mineral, expresados en mg de mineral/L de biomasa. Los metales Pb y Cr no fueron detectados, siendo el límite de cuantificación 10 µg/kg.

Tabla 3. Concentraciones máximas obtenidas para cada mineral en el cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus*, en fotobiorreactor de 25 L.

Minerales	C (mg/L)
N	910,60
C	595,55
P	86,24
K	262,38
Ca	168,71
Mg	32,78
Na	236,10
Fe	2,15
B	0,70
Mn	0,45
Zn	0,20
Cu	0,08
Pb	Nd
Cr	Nd

*Nd: No detectado

De lo expuesto sobre la evolución del perfil mineral del cultivo de microalgas se puede señalar que las máximas concentraciones de minerales se observó entre los días 6 y 17 de cultivo.

Del análisis del perfil mineral de la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en medio Allen & Arnon enriquecido con fuentes de nitrato y dióxido de carbono se puede señalar que esta microalga autóctona aislada del Embalse de Salto Grande posee una rica composición de minerales con potencialidad para la obtención de extractos que puedan ser aplicados como bioinsumos en cultivos de hortalizas.

3.4. Componentes bioactivos

Las microalgas poseen diferentes contenidos de estructuras químicas con actividad biológica. Hay algas en las que se han encontrado compuestos polifenólicos y carotenoides que intervienen en procesos fisiológicos de las mismas (Alí et al., 2014; López-Padrón et al., 2020).

En la Figura 7 se puede observar que el contenido de fenoles totales y carotenoides totales presentes en la biomasa microalgal deshidratada alcanzó su máxima concentración entre los días 12 y 16 de cultivo, siendo las concentraciones de fenoles totales y carotenoides totales 21,83±0,23mg EAG/gms y 436,72±23,84mg β-caroteno/gms; respectivamente.

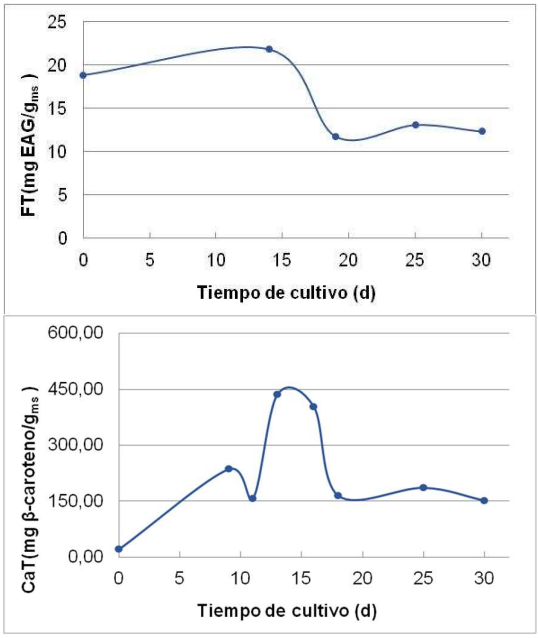


Figura 7. Evolución de la concentración de fenoles totales (FT) y carotenoides totales (CT) en función del tiempo de cultivo.

Ali et al. (2010), obtuvieron para cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus*, concentraciones de fenoles totales ligeramente superiores a los de la presente investigación (29,1 mg EAG/gms); mientras que Aburai et al., (2015) cuantificaron una acumulación de carotenoides totales en

microalga *Scenedesmus sp*. de 34,2±3,8 mg/gms, concentración 12 veces inferior a la obtenida en la presente investigación.

4. Conclusiones

Los resultados experimentales obtenidos al evaluar 8 tratamientos de cultivos de la microalga *Scenedesmus obliquus* con dos medios de cultivos diferentes (A&A y BG11), suplementados con fuentes de nitrato y carbono, muestran que el tratamiento que permitió desarrollar una mayor densidad celular, fue el medio de cultivo Allen & Arnon, con el tratamiento A&A cNO_3^- cCO_2 alcanzando 1,42 $\times 10^8$ células/mL. Dicho tratamiento también presentó mayor producción de biomasa 4,15g/L y rendimiento 5461,84%. Por lo cual se lo seleccionó para la producción de la microalga a mayor escala con la finalidad de obtener mayor cantidad de biomasa microalgal.

Los resultados experimentales obtenidos en la evolución de la densidad celular en función del tiempo de cultivo fueron descriptos por los modelos Logístico, Gompertz y de von Bertalanffy; siendo el primero el que mejor se ajustó a dichos resultados. Para el modelo cinético Logístico se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento de 1,31/d, tiempo de latencia de 0,3 d; tiempo de duplicación de 0,53 d y densidad celular máxima de $1{,}33\times10^7$ células/mL. Estos resultados indican que la microalga *Scenedesmus obliquus* tuvo una adecuada adaptación al medio de cultivo Allen & Arnon enriquecido con $NaNO_3$, KNO_3 y CO_2 en las condiciones ambientales estudiadas. La composición de nutrientes máxima fue, en mg/L: Na 236,10±1,18; K 262,38±1,91; Ca 168,71±2,81; Mg 32,78±0,49; B 0,70±0,01; Mn 0,45±0,00; Fe 2,15±0,02; Cu 0,08±0,00ppm; Zn 0,20±0,02; P 86,24±0,40; C 595,55±34,15; N 910,60±51,83 y de FT 21,83±0,23 mg EAG/gms y CT 436,72±23,84 mg β-caroteno/gms.

Las concentraciones obtenidas en el perfil mineral mostraron que la microalga *Scenedesmus obliquus* tuvo una composición rica en macro y micronutrientes, alcanzando las máximas concentraciones de minerales entre los días 6 y 17 de cultivo. Referido a los compuestos fenólicos se obtuvieron concentraciones comparables a las señaladas por otros investigadores, mientras que las concentraciones de carotenoides totales fueron superiores a valores publicados en la literatura. De lo expuesto se puede concluir que a partir del cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus* en medio Allen & Arnon enriquecido con $NaNO_3$, KNO_3 y CO_2 se puede obtener extracto para ser utilizado como bioinsumo en cultivos de hortalizas.

5. Referencias

Aburai, N.; Sumida, D.; Abe, K. (2015). *Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga Scenedesmus sp. (Chlorophyceae),* Algal Res 8, 3036.

Allen, M.M. (1968). *Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae,* J. Gen. Microbiol 51, 199 - 202.

Ali, HEA.; Shanab, SMM.; Shalaby, EAA.; Eldmerdash, U.; Abdullah, MA. (2014). *Detección de microalgas para actividades antioxidantes, carotenoides y contenido fenólico,* Mecánica aplicada y materiales 625, 156-159.

Arnon, D.I.; McSwain, B.D.; Tsujimoto, H.Y.; Wada, K. (1974). *Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin*, Biochim Biophys Acta 357, 231-245.

Andrade, CE.; Vera, AL.; Cárdenas, CH.; Morales, ED. (2009). *Biomass production of microalga Scenedesmus sp. with wastewater from fishery,* Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia 32, 126 – 134.

Arredondo-Vega, B.O.; Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México.

Baglieri, A.; Sidella, S.; Barone, V.; Fragalà, F.; Silkina, A.; Nègre, M.; Gennari, M. (2016). *Cultivating Chlorella vulgaris and Scenedesmus quadricauda microalgae to degrade inorganic compounds and pesticides in wáter,* Environ Sci Pollut Res 23,18165–18174.

Barone, V.; Baglieri, A.; Stevanato, P.; Broccanello, C.; Bertoldo, G.; Bertaggia, M.; Cagnin, M.; Pizzeghello, D.; Moliterni, VMC.; Mandolino, G.; Fornasier, F.; Squartini, A.; Nardi, S.; Concheri, G. (2018). *Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (Beta vulgaris L.)*, J. Appl. Phycol 30,1061–1071.

Borowitzka, M.A. (2013). *High-value products from microalgae—their development and commercialisation*, J Appl Phycol 25,743–756.

Bordet, F.; Lopéz, C.; Panozzo Zénere, V. (2012). *Monitoreo emergencia de floración de Cianobacterias: Áreas recreativas-Embalse Salto Grande,* Segunda Edición Programas Ambientales

de Salto Grande. Salto Grande Argentina-Uruguay.

Brennan, L.; Owende, P. (2010). *Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Renew Sust Energ Rev 14, 557–577.

Castro, G.; Valbuena, E.; Sánchez, E.; Briñez, W.; Vera, H.; Leal, M. (2008). *Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de Lactococcus lactis subsp. Lactis*, Rev. Cient. Fac. Cien. V. 18, 582-588.

Cayré, M.E.; Vignolo, G.M.; Garro, O.A. (2007). *Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y brochothrix thermosphacta sobre emulsiones cárnicas cocidas*, Información Tecnológica 18, 23-29.

Chagnon, M.; Kreutzweiser, D.; Mitchell, EAD.; Morrissey, C.A.; Noome, DA.; Van der Sluijs, J.P. (2015). *Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services*, Environ Sci Pollut Res 22, 119–134.

Coppens, J.; Lindeboom, R.; Muys, M.; Coessens, W.; Alloul, A.; Meerbergen, K.; Lievens, B.; Clauwaert, P.; Boon, N.; Vlaeminck, SE. (2016). *Nitrification and microalgae cultivation for two-stage biological nutrient valorization from source separated urine*, Bioresour Technol 211, 41–50.

Dammak, M.; Hadrich, B.; Barkallah, M.; Hentati, F.; Ben Hlima, H.; Pichon, C.; Denis, M.; Fendri, I.; Michaud, P.; Abdelkafi, S. (2018). *Modelling Tetraselmis sp. growth-kinetics and optimizing bioactive-compound production through environmental conditions,* Bioresour. Technol 249, 510-518.

Encarnação, T.; Pais, A.A.C.C.; Campos, M.G.; Burrows, H.D. (2015). *Cyanobacteria and microalgae: a renewable source of bioactive compounds and other chemicals*, Science Progress, 98, 145 – 168.

García-Gonzalez, J.; Sommerfeld, M. (2016). *Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga Acutodesmus dimorphus.* J Appl Phycol 28, 1051–1061.

García-Gozalbes, C.C.; Arbib, Z.; Perales-Vargas-Machuca, J. A. (2015). *Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento*. Tecnología y Ciencias del Agua, 6(1), 49-68.

Ji, M.K.; Yun, H.S.; Park, S.; Lee, H.; Park, Y.T.; Bae, S.; Choi, J. (2015). *Effect of food wastewater on biomass production by a green microalga Scenedesmus obliquus for bioenergy generation,* Bioresource technology 179, 624-628.

Jiménez Veuthey, M.; Vidal, NM.; Cabrera, C.; Paramo, J.; Bertoni, M.; Bordet, HF.; Andrade Belgeri, MS.; Flores, ML. Zapata LM. (2018). *A simple, efficient and economical method for isolation of Scenedesmus obliquus (Chlorophyceae) from freshwater sample (Embalse Salto Grande, Argentina)*, Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences 20, 6-12.

Köhler, HR.; Triebskorn, R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. Science 341:759–765

Koya, P.R.; Goshu, A.T. 2013. Generalized Mathematical Model for Biological Growths. Model. Int. J. Model. Simul. 1: 42-53.

Lira, G.M.; Lopez, A.M.Q.; Firmino, G.O.; Santos, S.D.; Bezerra, R.D.S. (2017). *Total carotenoids and antioxidant activity of fillets and shells (in natura or cooked) of "Vila Franca" shrimp (Litopenaeus Schmitti) in different intervals of storage under freezing*. Ciência e Agrotecnologia, 41, 94-103.

López-Padrón, I.; Martínez-González, L.; Pérez-Domínguez, G.; Reyes-Guerrero, Y.; Núñez-Vázquez, M.; Cabrera-Rodríguez, J. A. (2020). *Las algas y sus usos en la agricultura. Una visión actualizada,* Cultivos Tropicales 41.

Michalak, I.; Chojnacka, K. (2014). *Algal extracts: Technology and advances,* Engineering in life sciences 14, 581-591.

Nabti, E.; Jha, B.; Hartmann, A. (2017*). Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer* Int J Environ Sci Technol 14, 1119–1134.

Odegard, RYI.; van der Voet, E. (2014). *The future of food—scenarios and the effect on natural resource use in agriculture in 2050*, Ecol Econ 97, 51–59.

Pacholczak, A.; Nowakowska, K.; Pietkiewicz, S. (2016). *The effects of synthetic auxin and a seaweed-based biostimulator on physiological aspects of rhizogenesis in ninebark stem cuttings*, Not Bot Horti Agrobo 44, 85–91.

Pagnussatt, F.A.; Kupski, L.; Toralles Darle, F.; Freitas Filoda, P.; Medeiros del Ponte, É.; Garda-Buffon, J.; Badiale-Furlong, E. (2013). *Fusarium*

graminearum growth inhibition mechanism using phenolic compounds from Spirulina sp. Ciênc Tecnol Aliment Campinas 33, 78-80.

Povero, G.; Mejia, JF.; Di Tommaso, D.; Piaggesi, A.; Warrior, P. (2016). *A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants*, Front. Plant Sci. 7,435.

Quevedo, C.; Morales, S. P.; Acosta, A. (2008). *Crecimiento de Scenedesmus sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal*, Vitae 15, 25-31.

Vásquez-Villalobos,V.; Artega-Gutiérrez, P.; Chanamé-Acevedo, K.; Esquivel-Torres, A. (2013). *Modelamiento matemático y por redes neuronales artificiales del crecimiento de Spirulina sp. en fotobiorreactor con fuente de luz fluorescente e iluminación en estado sólido.* Scientia Agropecuaria 4: 199-209.

Vigani, M.; Parisi, C.; Rodríguez-Cerezo, E.; Barbosa, MJ.; Sijtsma, L.; Ploeg, M.; Enzing, C. (2015). *Food and feed products from micro-algae: market opportunities and challenges for the EU*, Trends Food Sci Technol 42, 81–92.

Wiltshire, KH.; Boersma, M.; Möller, A.; Buhtz, H. (2000). *Extraction of pigments and fatty acids from the green alga Scenedesmus obliquus (Chlorophyceae)*, Aquatic Ecology 34, 119-126.

Zwietering, MH; Jongenburger, I; Rombouts, FM; Van's Riet, K. (1990). *Modeling of the bacterial growth curve.* Appl Environ Microbiol 56, 1875–81.

14TCA - Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de *Rosa gallica* sobre bacterias bucales Gram (+)

Evaluation of the antimicrobial effect of *Rosa gallica* extracts on Gram (+) oral bacteria

[1]Vázquez-Olvera, L. A.; [2]Vargas-Segura, A. I.; [1]Ramos-González, R.; [1]Anna Iliná.; [1]Segura-Ceniceros, E. P.*

1. Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Ing. J. Cárdenas Valdez S/N, Col. República, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, México.
2. Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Odontología, Dra. Cuquita Cepeda de Dávila, Adolfo López Mateos, C.P. 25125, Saltillo, Coahuila, México.
e-mail de contacto: psegura@uadec.edu.mx

Resumen

Las enfermedades orales causadas por bacterias son un problema global, las cuales representan una carga importante para el sector salud a nivel mundial, los principales microorganismos responsables de las enfermedades bucales son: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus acidophilus* que están asociados a la caries dental. El objetivo de la presente investigación es obtener extractos acuosos y etanólicos de *Rosa gallica* usando la técnica de extracción asistida por microondas (MAE) a diferentes condiciones de potencia (W) y tiempo (min), caracterizar los compuestos bioactivos mediante pruebas fitoquímicas cualitativas y cromatografía liquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), así como la evaluación del efecto antimicrobiano por el método de difusión en pozo sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. Los resultados de las diferentes condiciones de extracción por microondas mostraron hasta un 98% de rendimiento en hojas y flor de las extracciones acuosas a potencias de 1000 W y 700 W. Los principales metabolitos secundarios identificados pertenecen en su mayoría a la familia de los flavonoides y aceites esenciales. La evaluación del efecto antimicrobiano por difusión en pozo muestra halos de inhibición ligeramente mayores en extracciones acuosas para ambas cepas usando la planta en su totalidad. Los ensayos demostraron que los compuestos bioactivos obtenidos de *Rosa gallica*, tienen efecto antimicrobiano sobre las bacterias de estudio, lo que puede ser una vía para el control de las enfermedades bucales.

Palabras clave: Extracciones, microondas, *Rosa gallica*, efecto antimicrobiano.

Abstract

Oral diseases caused by bacteria are a global problem, which represent an important burden for the health sector worldwide, the main microorganisms responsible for oral diseases are *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus acidophilus* that are associated with dental caries. The aim of this research is to obtain aqueous and ethanolic extracts of *Rosa gallica* using the microwave assisted extraction technique (MAE) at different conditions of power (W) and time (min), to characterize the bioactive compounds through qualitative phytochemical tests and chromatography high resolution liquid coupled to mass spectrometry (HPLC-MS), as well as the evaluation of the antimicrobial effect by the well diffusion method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. The results of the different microwave extraction conditions showed up to 98% yield in leaves and flower of the aqueous extractions at powers of 1000 W and 700 W. The main secondary metabolites identified belong mostly to the family of flavonoids and essential oils. Evaluation of the antimicrobial effect by well diffusion shows slightly higher inhibition halos in aqueous extractions for both strains using the whole plant. The trials showed that the bioactive compounds obtained from *Rosa gallica* have an antimicrobial effect on the study bacteria, which may be a way to control oral diseases.

Keywords: Extractions, microwave, *Rosa gallica*, antimicrobial effect.

1. Introducción

Las enfermedades bucales representan un punto importante para el sector salud a nivel mundial causadas por bacterias; siendo la caries dental el principal padecimiento que afecta entre el 60-90% a niños y casi el 100% a adultos (Bustillos, 2020; Metrics, 2019; Moromi *et al*., 2014). Los principales microorganismos aislados de las lesiones cariosas son *Streptococcus mutans*, *Actinomyces sp* y *Lactobacillus sp*. (Pimentel *et al*., 2015). La inhibición de estas bacterias se lleva a cabo con el uso de antibióticos (antimicrobianos). Actualmente la medicina natural, a partir de plantas ha recibido gran atención, ya que presentan actividad antibacteriana capaz de actuar sobre agentes patógenos como *Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans y Porphyromonas gingivalis* (Moromi, 2009; Gamboa, 2015; Xiao *et al*., 2018; Ayati *et al*., 2018). El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto antimicrobiano de extractos acuosos y etanólicos de *Rosa gallica* sobre bacterias causantes de la caries dental usando la técnica de difusión en disco; así como la identificación de los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención de extractos mediante la técnica asistida por microondas.

Se estudiaron las variables de tiempo a: 1.5, 3.5 y 5.5 min a una potencia de: 1000W, 700W y 500W respectivamente y tipo de solvente (Agua y etanol absoluto) por triplicado (3 niveles), empleando las distintas partes de la planta (tallo, flores, hojas y planta en su totalidad). La muestra se pesó en una balanza analítica y se mescló con el solvente adecuado a una concentración final del 2% (p/v). El equipo de Microondas a emplear se programó de acuerdo a las condiciones a estudiar. Con el fin de recuperar el sobrenadante, al término de la extracción, la muestra fue centrifugada y filtrada a través de papel filtro Whatman #4. Posteriormente el extracto filtrado se guardó a una temperatura de refrigeración (2° C ± 1° C) para su posterior uso. El porcentaje de rendimiento se calculó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{rendimiento real}}{\text{rendimiento teórico}} x\ 100$$

2.2 Pruebas fitoquímicas cualitativas

Se utilizaron los extractos acuosos y etanólicos obtenidos de *Rosa gallica*, para evaluar los compuestos bioactivos presentes de acuerdo con las técnicas presentes en la tabla 1.

Tabla 1. Ensayos para pruebas fitoquímicas cualitativas

Ensayo	Metabolito	Numero
$KMnO_4$	Insaturaciones	1
NaOH 10%	Cumarinas/Lactonas	2
Liebermann-Burchard	Esteroides	3
Cloruro Férrico	Taninos y Fenoles	4
Shinoda	Flavonoides	5
Salkowsky	Esteroles y Triterpenos	6

Se realizaron los ensayos fitoquímicos en una placa de porcelana, colocando en cada pocillo 500 µL del reactivo correspondiente con 500 µL de extracto (2000 ppm), y se observan los cambios de color indicativo de la presencia de los metabolitos secundarios.

2.3 Análisis de compuestos bioactivos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (HPLC-MS).

Se prepararon muestras a una concentración de 2000 ppm (p/v) de extractos acuosos y etanólicos en viales para HPLC, donde se colocaron 1.5 mL de extracto en cada vial previamente microfiltrado con un microfiltro (miliphore) de 0.2 µm (Fig. 1).

Fig. 1. Viales de extractos acuosos y etanólicos de *R. gallica* a 1000 W

Posteriormente, se llevaron al equipo de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas y se inyectaron 5 µl de las muestras en una columna Denali C18 (150 mm x 2.1 mm, 3 µm, Grace, EE. UU.). La temperatura del horno se mantuvo a 30 ° C. Los eluyentes fueron ácido fórmico (0.2%, v / v; disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: inicial, 3% B; 0-5 min, 9% B lineal; 5 a 15 min, 16% de B lineal; 15–45 min, 50% B lineal. A continuación, la columna se lavó y se reacondicionó. El caudal se mantuvo a

0.2 ml / min y la elución se controló a 245, 280, 320 y 550 nm. Se inyectó todo el efluente (0.2 ml / min) en la fuente del espectrómetro de masas, sin dividirlo. Todos los experimentos de EM se llevaron a cabo en modo negativo [M-H] -1. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. Los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de pulverización 5.0 kV y voltaje capilar y temperatura fueron 90.0 V y 350 ° C, respectivamente. Los datos se recopilaron y procesaron utilizando el software MS Workstation (V 6.9). Las muestras se analizaron en primer lugar en modo de barrido completo adquiridas en el rango m / z 50-2000 (Ascacio-Valdés *et al*., 2016).

2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozo.

Para las pruebas de inhibición en pozo se utilizó la planta en su totalidad de los extractos acuosos y etanólicos de *Rosa gallica* a una concentración de 2000 ppm sobre las cepas *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, como controles negativos se usó agua y etanol absoluto, como control positivo se utilizó clorhexidina. Se realizó la siembra de la bacteria de interés sobre placa de Agar BHI y Agar MRS Lactobacillus para las cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* respectivamente. Posteriormente se hicieron 4 pocillos por caja de aproximadamente 5 mm de diámetro, donde 3 pocillos serán el extracto a una determinada concentración y 1 pocillo será el control positivo (clorhexidina). En cada pocillo se depositan 20 µL de extracto y se dejará reposar por 1 minuto, esto para dejar que el extracto se acople al medio de cultivo. Para el caso del antibiótico se colocan 10 µL. Se incuban a 37 ± 1° C por 24 a 36 horas y una vez transcurrido el tiempo, se miden los halos de inhibición obtenidos por la metodología de Kareru *et al*. (2008).

2.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza mediante un diseño completamente al azar empleando la prueba T de Student con una significancia de $P \leq 0.05$ con la finalidad de observar si existe alguna diferencia significativa entre las medias de los tratamientos de extracción por microondas.

3. Resultados y Discusión

3.1 Obtención de extractos mediante la técnica asistida por microondas.

En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de rendimiento obtenidos en los extractos bajo diferentes condiciones de potencia; donde se observa que las extracciones que fueron realizadas a tratamientos de exposición de microondas en 1000, 700 y 500 W arrojan mejores rendimientos 98.0, 74.3 y 26.3 respectivamente en la flor de la planta para el caso de las extracciones acuosas; mientras que en las extracciones etanólicas, el mejor rendimiento de 10.8, 9.7 y 12.7 se observa en la planta completa.

Tabla 2. Porcentaje de rendimientos de extractos acuosos y etanólicos de *Rosa gallica* a 1000 W, 700 W y 500 W.

Extractos Acuosos			
	1000 W	**700 W**	**500 W**
	% Rendimiento		
Hojas	4.2 ± 1.8	97.3 ± 4.5	15.3 ± 1.4
Flor	98.0 ± 2.5	74.3 ± 30.5	26.3 ± 2.6
Tallo	2.9 ± 0.4	9.5 ± 6.5	7.3 ± 6.9
Planta total	28.5 ± 6.5	14.3 ± 6.5	13.0 ± 4.0
Extractos etanólicos			
	1000 W	**700 W**	**500 W**
	% Rendimiento		
Hojas	10.3 ± 0.8	8.1 ± 1.7	10.7 ± 1.3
Flor	4.1 ± 1.1	3.7 ± 0.9	2.6 ± 1.2
Tallo	4.9 ± 0.8	4.9 ± 1.0	6.3 ± 0.1
Planta total	10.8 ± 1.4	9.7 ± 1.3	12.7 ± 0.6

NOTA: Todos los ensayos fueron realizados por triplicado

De acuerdo con los resultados obtenidos, las partes como la hoja y flor de *Rosa gallica* arrojan los mejores resultados para el solvente acuoso para cada una de las potencias de extracción. Por otro lado, los mejores rendimientos para el solvente etanólico se vieron reflejados en la planta en su totalidad en cada una de las potencias (W). Navarro *et al*., (2018) y Rubio & Rodríguez, (2018) reportan que el etanol absoluto, a pesar de que es ampliamente utilizado en extracciones solido-liquido, no presenta alta selectividad en compuestos como las soluciones acuosas, sin embargo, ambos solventes conducen a altos rendimientos de extracción y son ampliamente usados. Estos resultados están altamente ligados con las técnicas

de extracción, como lo es la extracción asistida por microondas, donde según lo reportado por Loredo *et al*., (2017) esta técnica es amigable con el ambiente por que minimiza el uso de solventes químicos y energía empleada, además de acortar de manera considerable los tiempos de extracción. Según lo reportado por Nayak *et al*., (2015) la extracción asistida por microondas es estudiada para la obtención de compuestos fenólicos.

3.2 Pruebas fitoquímicas cualitativas

Los resultados obtenidos indican que los compuestos bioactivos obtenidos en los extractos acuosos de las hojas y la flor de la planta son principalmente flavonoides dando positivo en la prueba Shinoda y oxidrilos fenólicos y taninos en la prueba de $FeCl_3$. Por otro lado, en los extractos etanólicos se observa en las hojas de la planta presencia de insaturaciones en la prueba de $KMnO_4$, aun así, se observa una buena coloración para las demás pruebas, que se confirman al usar la planta de *R. gallica* en su totalidad (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos bioactivos presentes en extractos de *Rosa gallica*.

Prueba	1	2	3	4	5	6
1000 W (Acuoso)						
Hojas	+++	+	+++	+++	++	-
Flor	++	+	++	+++	++	-
Tallo	++	+	++	+++	-	-
Planta total	+++	++	+++	+++	++	-
1000 W (Etanol)						
Hojas	+++	+	++	++	+	+
Flor	+	+	++	++	+	-
Tallo	++	+	++	+	+	-
Planta total	+++	+	++	++	+	+

De acuerdo con Benfica *et al*., (2021) la selectividad de un solvente para extracción de compuestos está fuertemente asociada con la polaridad de la molécula de interés, por lo que mediante el uso de agua y etanol se espera obtener moléculas polares. De acuerdo con Sarangowa *et al*., (2014) dentro de los ejemplares vegetales del género de Rosa se pueden observar flavonoides en ensayos fitoquímicos. Por otro lado, se observa que la coloración para la prueba de cumarinas y lactonas es mínima, y según Díaz *et al*., (2015) la realización de pruebas fitoquímicas con extractos etanólicos pueden expresar una presencia muy leve o nula de agrupamientos lactónicos.

3.3 Análisis de compuestos bioactivos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (HPLC-MS).

En la tabla 4 se observan los compuestos bioactivos de *Rosa gallica* que fueron identificados a partir del análisis de la planta en su totalidad de extractos acuosos y etanólicos. Para ello se evaluaron solamente los tratamientos a 1000 W. En el presente análisis se observan en su mayoría compuestos de la familia de los flavonoides.

Tabla 4. Compuestos bioactivos de *Rosa gallica* por HPLC-MS

Tiempo (Min)	Masa	Familia	Compuesto
Planta total (Extracto acuoso)			
3.83	341.0	Ácido cafeico 4-O-glucosido	Ácido hidroxicinamico
8.90	330.9	Acido gallico 4-O-glucosido	Ácido hidroxibenzoico
12.92	254.9	Pinocembrina	Flavanonas
13.62	344.9	Rosmanol	Terpenos fenólicos
17.27	288.9	(+)-Catequina	Catequinas
21.49	289.0	(-)-Epicatequina	Catequinas
26.90	625.0	Quercetin 3,4'-O-diglucosido	Flavonoles
30.92	462.9	Quercetin 4'-O-glucosido	Flavonoles
Planta total (Extracto etanólico)			
9.37	330.9	Ácido cafeico 4-O-glucosido	Ácido hidroxibenzoico
13.98	344.9	Rosmanol	Terpenos fenólicos
20.38	289.0	(-)-Epicatequina	Catequinas
30.74	463.0	Quercetin 4'-O-glucosido	Flavonoles
27.96	371.1	Sinensetina	Metoxyflavonas
17.98	288.9	(+)-Catequina	Catequinas
20.65	289.0	(-)-Epicatequina	Catequinas

26.44	371.1	Sinensetina	Metoxyflavonas

De acuerdo con el estudio realizado por Biharee *et al*., (2020), los flavonoides son de alta importancia, ya que estos metabolitos secundarios se caracterizan por su potencial antimicrobiano y antiinflamatorio. En este análisis por HPLC se observan variantes de los compuestos de la familia de los flavonoides, donde según estudios de Soto-Vásquez, (2015) las flavonas, flavononas, metoxyflavonas, flavonoles, se destacan por su actividad antioxidante y antimicrobiana debido a la presencia de grupos hidroxilo de tipo fenólico en la mayoría de sus estructuras químicas. Dentro de la lista de compuestos se observan los ácidos fenólicos que, de acuerdo con Aguilar, (2011) son divididos en 2 grupos: ácidos hidroxicinamicos y ácidos hidroxibenzoicos los cuales son de gran importancia en el sector farmacéutico, agronómico y alimentario por su potencial biológico como agente antimicrobiano.

3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozo

En la Tabla 5 se muestran los halos de inhibición obtenidos para *Streptococcus mutans* (Fig 2a y 2b) y en la tabla 6 para *Lactobacillus acidophilus* (Fig 3a y 3b). Cada prueba se realizó por triplicado donde los halos fueron medidos con un vernier convencional.

Fig. 2(a). Efecto antimicrobiano por difusión en pozo de extracto acuoso de *Rosa gallica* sobre *S. mutans*

Fig. 2(b). Efecto antimicrobiano por difusión en pozo de extracto etanólico de *Rosa gallica* sobre *S. mutans*

Tabla 5. Efecto inhibición por el método de difusión en pozo de extractos acuosos y etanólicos de *Rosa gallica* sobre *Streptococcus mutans*

Extracto acuoso	Halo de inhibición (cm)
1000 W (Ac)	0.91 ± 0.08
700 W (Ac)	0.61 ± 0.23
500 W (Ac)	0.25 ± 0.15
Extracto etanólico	
1000 W (Et)	0.37 ± 0.29
700 W (Et)	0.33 ± 0.16
500 W (Et)	0.15 ± 0.23
Control (+)	2.48 ± 0.34

Fig. 3(a). Efecto antimicrobiano por difusión en pozo de extracto acuoso de *Rosa gallica* sobre *L. acidophilus*

Fig. 3(b). Efecto antimicrobiano por difusión en pozo de extracto etanólico de *Rosa gallica* sobre *L. acidophilus*

Tabla 6. Efecto inhibitorio por método de difusión en pozo de extractos de *Rosa gallica* sobre *Lactobacillus acidophilus*

Extracto acuoso	Halo de inhibición (cm)
1000 W (Ac)	0.81 ± 0.18
700 W (Ac)	0.28 ± 0.26
500 W (Ac)	0.23 ± 0.09
Extracto etanólico	
1000 W (Et)	0.06 ± 0.01
700 W (Et)	0.07 ± 0.03
500 W (Et)	0.05 ± 0.03
Control (+)	2.03 ± 0.78

El extracto acuoso muestra una inhibición ligeramente mayor (0.91 ± 0.08 cm) que el extracto etanólico, (0.81 ± 0.18 cm) esto tanto para *S. mutans* como para *L. acidophilus*. De acuerdo con Silipo *et al*., (2015), reporta que los extractos etanólicos de *Rosa gallica* pueden mostrar un halo de inhibición de hasta 23 mm usando las hojas, flor o el tallo de la planta, datos que difieren en este estudio ya que los halos de inhibición medidos son de menor diámetro, sin embargo, esto puede deberse a distintos factores, como la región donde se recoleta la planta, la estación del año y otras cuestiones geográficas que provocan que exista presencia o ausencia de un metabolito secundario en una parte especifica de la planta.

4. Conclusiones

El uso de hojas y flor de *Rosa gallica* arroja mejores rendimientos en cada tratamiento de la extracción por microondas. Las diferentes pruebas realizadas para la identificación de compuestos bioactivos expresan mayoritariamente compuestos de la familia de los flavonoides. En las pruebas de efecto antimicrobiano por difusión en pozo se observan halos ligeramente mayores en extractos acuosos y se observa que existe una inhibición para ambas cepas, por lo que, ambos extractos de *R. gallica* contienen compuestos que están generando una acción antimicrobiana.

5. Referencias

Aguilar-Cristóbal, N. (2011). *Produccion / extraccion de compuestos bioactivos por cultivos en estado sólido*. CNBB, 1.

Agus, S., Achmadi, S. S., & Mubarik, N. R. (2017). *Antibacterial activity of naringenin-rich fraction of pigeon pea leaves toward Salmonella thypi*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(8), 725–728. https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.07.019

Al-Mamoori, F., & Al-Janabi, R. (2018). *Recent advances in microwave-assited extraction (MAE) of medicinal plants.* International Research Journal of Pharmacy, 9(6), 22–29. https://doi.org/10.7897/2230-8407.09684

Arredondo-Valdés, R., Hernández-Castillo, F. D., Rocandio-Rodríguez, M., Anguiano-Cabello, J. C., Rosas-Mejía, M., Vanoye-Eligio, V., Ordaz-Silva, S., López-Sánchez, I. V., Carrazco-Peña, L. D., & Chacón-Hernández, J. C. (2021). *In vitro antibacterial activity of moringa oleifera ethanolic extract against tomato phytopathogenic bacteria*. Phyton, 90(3), 895–906. https://doi.org/10.32604/phyton.2021.014301

Ascacio-Valdés. (2016). *The complete biodegradation pathway of pomegranate ellagitannis*, Journal of Basic Microbiology.

Ayati, Z., Amiri, M. S., Ramezani, M., Delshad, E., Sahebkar, A., & Emami, S. A. (2018). *Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review*. Current Pharmaceutical Design, 24(35), 4101–4124. https://doi.org/10.2174/1381612824666181010151849

Benfica, J., Morais, E. S., Miranda, J. S., Freire, M. G., C, R. De, Sousa, S. De, & Coutinho, J. A. P. (2021). *Aqueous solutions of organic acids as effective solvents for levodopa extraction from Mucuna pruriens seeds*. Science Direct, 274(June). https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119084

Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). *Fitoterapia Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance*. Fitoterapia, 146. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104720

Córdova-Guerrero, I., Aragon-Martinez, O. H., Díaz-Rubio, L., Franco-Cabrera, S., Serafín-Higuera, N. A., Pozos-Guillén, A., Soto-Castro, T. A., Martinez-Morales, F., & Isiordia-Espinoza, M. (2016). *Antibacterial and antifungal activity of Salvia apiana against clinically important microorganisms*. Revista Argentina de Microbiologia, 48(3), 217–221. https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.007

Díaz Solares, M., Cazaña Martínez, Y., Pérez Hernández, Y., Valdivia Ávila, A., Prieto Abreu, M., & Lugo Morales, Y. (2015). *Qualitative evaluation of secondary metabolites in extracts of morus alba L. (Mulberry) varieties and hybrids*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 20(3), 358–366.

Gamboa Jaimes, F. O. (2015). *Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del Streptococcus mutans: experiencias de investigación / Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of Streptococcus mutans: Research Experiences*. In Universitas Odontologica (Vol. 33, Issue 71, p. 76). https://doi.org/10.11144/javeriana.uo33-71.icmf

Kardinasari, E., & Devriany, A. (2020). *Phytochemical identification of bangka origin virgin green coconut oil: Anti-inflammatory and anti-bacterial potential*. Enfermeria Clinica, 30, 171–174. https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2019.10.062

Kareru P. G., Gachanja A. N., Keriko J M., K. G. M. (2008). *Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Used By Herbalists. Afr. J. Traditional*, Complementary and Alternative Medicines, 5(0000), 51–55.

Loredo, M., Hernandez, J., & Barragan, B. (2017). *Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (stenocereus stellatus) aplicando prettratamientos con microondas, ultrasonido y enzimaticos*. Redalyc, 51(2), 135–151.

Mao, Y., Robinson, J., & Binner, E. (2021). *Understanding heat and mass transfer processes during microwave- assisted and conventional solvent extraction*. Chemical Engineering Science, 233, 116418. https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.116418

Metrics, G. H. (2019). *Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990 – 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. NCBI, 1990–2017. https://doi.org/10.1016/S0140-6736

Moromi, H., Martínez Cadillo, E., & Ramos Perfecto, D. (2014*). Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Odontología Sanmarquina, 12(1), 25. https://doi.org/10.15381/os.v12i1.2910

Navarro, M., Tixier, A., Tenon, M., & Feuillere, N. (2018). *What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield*, composition. Elsevier, 39, 1946–1956. https://doi.org/10.1002/elps.201700397

Nayak, B., Dahmoune, K. Moussi, H. Remini, S. Dairi, O. Aoun, and M.Khodir. (2015). *Comparison of microwave, ultrasound and accelerate-assited solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels*. Food Chem. 187: 507-516.

Rubio, J., & Rodriguez, S. (2018). *"Extracción de compuestos bioactivos mediante pre- tratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas. Valorización del raspón de la uva*." UdeV, 1(1), 15.

Sanwal, N., Mishra, S., Sahu, J. K., & Naik, S. N. (2021). *Effect of ultrasound-assisted extraction on efficiency, antioxidant activity, and physicochemical properties of sea buckthorn (Hippophae salicipholia) seed oil*. Lwt, 153(June 2021), 112386. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112386

Sarangowa, O., Kanazawa, T., Nishizawa, M., Myoda, T., Bai, C., & Yamagishi, T. (2014). *Phytochemistry Flavonol glycosides in the petal of Rosa species as chemotaxonomic markers*. Phytochemistry, 107, 61–68. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.013

Silipo, A. T., Planinsic, R. M., Wittwer, E. D., Sprung, J., y Nicholson, W. T. (2015). *Secondary metabolites in plant extracts. A Case Approach to Perioperative Drug-Drug Interactions*, 123–128. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7495-1_23

Singh, S., Kumar Verma, D., Thakur, M., Tripathy, S., Patel, A. R., Shah, N., Lara Utama, G., Prakash Srivastav, P., Roberto Benavente-Valdés, J., Chávez-González, M. L., & Noe Aguilar, C. (2021). *Supercritical Fluid Extraction (SCFE) as Green Extraction Technology for High-value Metabolites of Algae, Its Potential Trends in Food and Human Health. Food Research International*, 150(May), 110746. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110746

Soto Vásquez, M. R. (2015). *Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de Piper peltatum L. y Piper aduncum L. procedentes de la región Amazonas*. Elsevier, 6(1), 33. https://doi.org/10.21895/incres.2015.v6n1.04

Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). *ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. Spectrochimica Acta* - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 241, 118636. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118636

Wong-paz, J. E., Aguilar-zárate, P., & Veana, F. (2020). *Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos*. TIP Revista

Especializada En Ciencias Químico-Biológicas, 23, 1–11.

Xiao, Z., Luo, J., Niu, Y., & Wu, M. (2018). *Characterization of key aroma compounds from different rose essential oils using gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography–olfactometry and partial least squares regression*. Natural Product Research, 32(13), 1567–1572. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1389933

15TCA - Purificación de galactooligosacáridos por fermentación

Galactooligosaccharides purification by fermentation

Claudia Inés Vénica, Ailén Antonela Furrer, María Cristina Perotti.

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-UNL/CONICET). Facultad de Ingeniería Química. Santiago del Estero 2829 – S3000AOM Santa Fe, Argentina. clauvenica@fiq.unl.edu.ar.

Resumen

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos prebióticos que se sintetizan a partir de la lactosa con enzimas β-galactosidasas, generando una mezcla compuesta por GOS, lactosa residual, glucosa y galactosa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la performance de tres levaduras *Saccharomyces* comerciales (L1, L2 y L3) para purificar los GOS presentes en una mezcla comercial (C) y en una obtenida experimentalmente vía enzimática a partir de permeado de suero concentrado en lactosa (E). Las mezclas se incubaron con las levaduras (30 ºC/24 h) y se determinó el pH, crecimiento microbiano y perfil de carbohidratos. El pH disminuyó en todos los casos presentando la L3 los menores valores. Se observó desarrollo microbiano en todas las fermentaciones excepto para la mezcla C con L2. Para la mezcla C con L1 y L2 no se observó disminución de carbohidratos, mientras que con L3 se metabolizó principalmente la glucosa y en menor medida de galactosa alcanzando un factor de purificación (FP) de 1,25. En la mezcla E, todas las levaduras fueron capaces de purificar los GOS, arrojando L3 los mejores valores de purificación con un FP de 1,67. Según estos resultados, la levadura L3 mostró la mejor performance de purificación en las condiciones ensayadas.

Palabras clave: Galactooligosacaridos, β-galactosidasa, levaduras, purificación.

Abstract

Galactooligosaccharides (GOS) are prebiotic carbohydrates that are synthesized from lactose with β-galactosidase enzymes, generating a mixture composed of GOS, residual lactose, glucose and galactose. The objective of this work was to evaluate the performance of three commercial *Saccharomyces* yeasts (L1, L2 and L3) to purify the GOS present in a commercial mixture (C) and in one obtained experimentally via enzymatic method from whey permeate concentrated in lactose (E). The mixtures were incubated with the yeasts (30 ºC/24 h) and the pH, microbial growth and carbohydrate profile were determined. pH decreased in all cases, and the lowest values were for L3. Microbial growth was observed in all fermentations except for mixture C with L2. For the mixture C with L1 and L2, no decrease in carbohydrates were observed, while with L3, glucose was mainly metabolized and to a lesser extent galactose, reaching a purification factor (FP) of 1.25. In mixture E, all yeasts were able to purify the GOS, yielding L3 the best results with a FP of 1.67. According to these results, yeast L3 showed the best purification performance under the conditions tested.

Keywords: Galactooligosaccharides, β-galactosidase, yeast, purification.

1. Introducción

Los galactooligosacáridos (GOS) son reconocidos como carbohidratos bioactivos. Se encuentran naturalmente en la leche humana y a nivel de trazas en la leche de rumiantes. Asimismo, los GOS se producen a nivel industrial para ser usados como ingredientes funcionales. De hecho, el desarrollo de fórmulas infantiles ha impulsado la obtención de mezclas de GOS para ser incorporadas en estos productos como factor bifidogénico (prebiótico), de manera de simular lo más posible la leche humana (Barile y Rastall, 2013). Un estudio reciente ha demostrado que el consumo diario de jarabe conteniendo GOS mejoró el bienestar mental y redujo los niveles de ansiedad, al tiempo que aumentó las bifidobacterias beneficiosas en el microbioma intestinal (Johnstone *et al*., 2021). Los GOS se los emplea también en otros alimentos por sus interesantes propiedades: estabilidad al medio ácido y a las temperaturas elevadas, excelente sabor y bajo poder edulcorante, bajo poder calórico y anticariogenicidad (Torres *et al*., 2010).

La fórmula genérica puede representarse como [Galactosa]n-Glucosa, donde "n" corresponde a las unidades de galactosa. Se obtienen por procesos enzimáticos por acción de la β-galactosidasa sobre

la lactosa, en una reacción de transgalactosilación que ocurre simultáneamente con la reacción de hidrólisis; la enzima hidroliza el enlace glicosídico β (1-4) de la lactosa (galactosil β(1-4) glucosa) produciendo galactosa y glucosa, en forma simultánea la galactosa se transfiere a la unidad de galactosa de otra molécula de lactosa y como resultado se obtiene una mezcla compuesta por lactosa (residual), monosacáridos (glucosa y galactosa) y oligosacáridos de galactosa con diferente grado de polimerización (GP) (Ackerman *et al.*, 2017). Para obtener altos rendimientos en GOS se emplean soluciones con elevado contenido de lactosa, por lo que el suero de quesería representa la principal materia prima; dado que es un subproducto de la industria láctea altamente contaminante, su aprovechamiento a través del aislamiento o transformación de sus valiosos componentes es un tema actual y resulta muy beneficioso para la industria láctea, contribuyendo positivamente al cuidado del medio ambiente (Gómez Soto y Sánchez Toro, 2019).

Las preparaciones comerciales de GOS contienen 50-70% (en base seca) de GOS, y un total de lactosa glucosa y galactosa de 30-50%. Solo unas pocas preparaciones tienen altos niveles de GOS (> 90%) (Guerrero *et al*., 2014; Vera *et al.*, 2016). En efecto, la investigación actual y los mayores desafíos se centran en conseguir productos más puros, lo que se puede lograr empleando β-galactosidasas con mayor especificidad de síntesis (es decir, que predomine la reacción de transgalactosilación frente a la de hidrólisis) y aplicando procesos de purificación posteriores. La presencia de mono- y disacáridos en la mezcla se considera indeseable desde el punto de vista del efecto prebiótico del producto. Además, la obtención de preparaciones puras de GOS diversificaría su aplicación como ingrediente en otro tipo de alimentos tales como, productos para diabéticos, bajos en calorías y reducidos en azúcares, alimentos para animales (ganado y mascotas) y, más allá del sector alimentario, se podrían emplear en productos farmacéuticos y cosméticos (Torres *et al*., 2010; Michelon *et al*., 2014; Sangwan *et al*., 2014).

Se han reportado varias estrategias de purificación tales como la cromatografía de exclusión molecular, tecnología de membranas, tratamiento con carbón activado y fermentación microbiana (Hernández *et al*., 2009; Torres *et a*l., 2010; Moreno *et al*., 2014; Tokošová *et al*., 2016; Vera *et al*., 2016). Particularmente, la fermentación microbiana es una alternativa tecnológica plausible para el propósito buscado. La misma se fundamenta en la eliminación selectiva de los azúcares presentes (glucosa, galactosa y lactosa residual), que son metabolizados por diferentes microorganismos (levaduras y bacterias lácticas), lográndose de esta manera, incrementar la concentración de GOS. Este procedimiento puede realizarse aplicando una o varias etapas sucesivas de fermentación con diferentes microorganismos (Goulas *et al*., 2007; Sangwan *et al*., 2014). Goulas *et al.* (2007) partiendo de una mezcla comercial de GOS, consiguieron con *Saccharomyces cerevisiae* eliminar gran parte de la glucosa, mientras que la galactosa disminuyó muy poco y la lactosa no se modificó; en el mismo trabajo, pero partiendo de una mezcla de GOS producida con enzimas de *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 a partir de una solución de lactosa y permeado de suero en polvo, también lograron disminuir la glucosa (92%) y ligeramente la galactosa (3,6%). Sangwan *et al.* (2014) purificaron una mezcla de GOS, preparada a partir de suero suplementado con lactosa y una β-galactosidasa extraída de *Streptococcus thermophilus*, con sucesivos pasos de fermentación con *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Lactobacillus helveticus.* Consiguieron una reducción de monosacáridos entre 39,3 y 3,6% y de disacáridos de 24,4 y 4,6%. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se realizó la purificación de una mezcla de GOS obtenida a partir de un permeado de suero concentrado líquido.

Teniendo en cuenta lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la performance de levaduras comerciales para purificar los GOS presentes en una mezcla comercial y en una obtenida a partir de permeado de suero concentrado en lactosa.

2. Materiales y métodos

Materiales

Levaduras *Saccharomyces* comerciales, L1 y L2 (liofilizadas, SACCO, Italia), y L3 (instantánea seca en gránulos, Levex®, Argentina).

β-galactosidasa comercial de *K. lactis* (GODO YNL-2, Japón).

Permeado de suero concentrado en lactosa (14,2 g/100 g) (Milkaut S. A., Argentina).

Ingrediente jarabe de GOS comercial: GOS total, 44,3 g/100 g (base húmeda) (31% GP2, 38% GP3, 18% GP4, 8% GP5 y 5% GP6 y GP>6); lactosa, 15,8 g/100 g; glucosa, 14,3 g/100 g, y galactosa, 0,8 g/100 g. Contenido de total de GOS en base seca: 59% (Friesland Campina, Países Bajos).

Preparación de la mezcla de GOS

Para obtener la mezcla de GOS experimental (E), se incubó el permeado de suero (4 L) con la enzima (1 g/L) a 42 °C por 60 minutos en un baño de agua. Finalizada la incubación la mezcla se calentó a 80 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Estas condiciones fueron puestas a punto en estudios previos (Amuchástegui, 2017). Se analizó el perfil de carbohidratos al final del proceso y se

calculó el rendimiento de GOS (R_{GOS}) (1) como el porcentaje en peso de GOS (M_{GOS}) con respecto a la masa de lactosa inicial (M_{LI}) (Vénica *et al.,* 2017):

$$R_{GOS} = M_{GOS}\ (g/100\ g)/M_{LI}\ (g/100\ g) \times 100 \quad (1)$$

Conviene aclarar que no se puede diferenciar las diferentes especies de GOS sintetizados. En efecto, se reporta que durante el proceso de síntesis y dependiendo de las condiciones de trabajo se producen varias especies de GOS con diferente GP (di-, tri-, tetra-, y mayor), y con diferente configuración del enlace entre los monómeros. En nuestro trabajo, según las condiciones analíticas empleadas, los GOS cuantificados corresponden a GP3 + GP4, según comparación con datos bibliográficos y análisis de patrones. No se puede diferenciar la lactosa de los otros posibles disacáridos formados, allolactosa y galactobiosa, ni se pueden detectar GOS con GP > 4 ya que eluyen con el frente de solvente (Guerrero e*t al*., 2014).

Preparación de las suspensiones de levaduras

En tubos de ensayos estériles, se preparó una suspensión acuosa de cada una de las levaduras en estudio: para L1 y L2, 0,1 g en 10 mL de agua estéril, y para L3, 1 g en 3 mL de agua estéril. Se agitó en Vortex por 30 segundos y se dejó hidratando en refrigeración por 3 h.

Purificación por fermentación selectiva

Una dilución de la mezcla comercial de GOS (20 g en 100 mL de agua destilada) (C) y la mezcla de GOS obtenida experimentalmente (E) se fraccionaron a razón de 100 mL en 3 frascos de vidrio, para cada caso, y se esterilizaron en autoclave. Se inoculó individualmente con las suspensiones de levaduras de manera de tener una concentración aproximada de 6 órdenes log UFC/mL (lo que se logró con 1,0, 0,1 y 3,0 mL de las preparaciones de las levaduras L1, L2 y L3, respectivamente). Los frascos se agitaron manualmente y se incubaron en estufa a 30 °C durante 24 h. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 8 y 24 h) para determinar el pH, el crecimiento microbiano y analizar el contenido de carbohidratos.
Se definieron los siguientes parámetros para evaluar el desempeño de la fermentación (Guerrero *et al*., 2014):

- Pureza (P): representa el porcentaje en masa de GOS (M_{GOS}) con respecto a los carbohidratos totales (M_{CT}), al inicio (P_i) y al final (P_f) del proceso, respectivamente; se calculó de la siguiente manera:

$$P_{i,f} = MGOS/MCT \times 100 \quad (2)$$

- Factor de purificación (FP). Se calculó de la siguiente manera:

$$PF = P_f/P_i \quad (3)$$

Las experiencias se realizaron por duplicado.

Análisis

Perfil de carbohidratos: las concentraciones de GOS, lactosa, glucosa y galactosa se analizó según Vénica *et al*. (2015), utilizando un sistema HPLC de intercambio iónico marca Perkin Elmer (USA). Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) y un guarda columna Aminex Cation-H^+ (30 mm x 4,6 mm) (Aminex, Biorad Laboratories, Estados Unidos). Las corridas cromatográficas se realizaron manteniendo la temperatura de la columna a 65 ºC, el flujo a 0,6 mL/min y empleando una fase móvil de H_2SO_4 0,01 M. Un detector de índice de refracción (IR) permitió la detección de los carbohidratos. La cuantificación (g/100 g) se realizó mediante calibración externa utilizando los estándares correspondientes (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Para la cuantificación de GOS, se utilizó el trisacárido rafinosa (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) como estándar.
Lo que se identificó como lactosa también incluyen los GOS GP2, esto se verificó analizando el ingrediente comercial.
Crecimiento microbiano: se realizó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm, empleando un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer, lambda 25, USA).
pH: se realizó con un pH metro digital Orion 3 star benchtop (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Se calculó el promedio, la desviación estándar y se aplicó análisis de variancia (ANOVA) de una vía y test de Tukey para detectar diferencias entre las levaduras ensayadas a cada tiempo y para cada mezcla, con un nivel de confianza del 95%. Asimismo, se aplicó ANOVA para analizar la evolución con el tiempo para cada fermentación. Los análisis se realizaron utilizando el software SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Resultados y Discusión

Producción de la mezcla de GOS

En la **Figura 1** se observan los cromatogramas de la materia prima (permeado de suero concentrado en lactosa) empleada para la preparación de la mezcla E, al inicio y final de la incubación con la enzima (42 °C por 60 min.). Se puede observar que

la lactosa disminuyó generando como productos de reacción GOS, glucosa y galactosa.
La concentración total de GOS en la mezcla E fue de 2,2 g/100 g (13,92%, respecto al total de carbohidratos), lo que representa un rendimiento de 15,4%. Asimismo, la composición de lactosa (residual), glucosa y galactosa fue de 4,39, 5,40 y 3,72 g/100 g, lo que representa un 27,96, 34,44 y 23,68 % del total de carbohidratos, respectivamente. Similares rendimientos en GOS fueron obtenidos por Vénica *et al.* (2017) utilizando la misma enzima y partiendo de una mezcla de leche y suero en polvo.

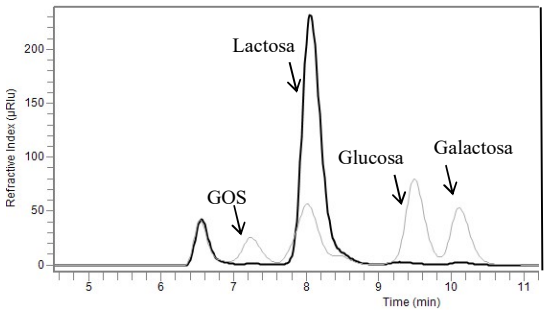


Figura 1. Cromatogramas superpuestos del permeado de suero (negro) y mezcla de GOS (gris).

Crecimiento microbiano y pH

La evolución de pH durante el proceso de fermentación selectiva con las diferentes levaduras, para las mezclas C y E se muestra en la **Figura 2 (A** y **B**, respectivamente). Se observó una disminución ($p<0,05$) con el tiempo de incubación en todos los casos hasta las 8 h. Luego, los valores se manutuvieron hasta las 24 h para todas las levaduras en C. En E, se observó una disminución ($p<0,05$) para L1 y L2, mientras que no hubo cambios para L3. Para ambas mezclas, los valores de pH para L3 fueron menores ($p<0,05$) que para L2 y L1; asimismo, L2 fue menor a L1 a las 24 h en C y L1 menor a L2 a las 8 h en E.
El crecimiento microbiano durante las fermentaciones de las mezclas C y E, medidas a través de la absorbancia se observan en la **Tabla 1**. Los valores aumentaron ($p<0,05$) durante la fermentación para todos los casos, a excepción de la mezcla C con L2. A su vez, el incremento en los valores de absorbancia fue más pronunciado en E que en C, indicando que hubo un mayor desarrollo microbiano en E respecto a C.
Para cada tiempo de muestreo, los valores fueron siempre mayores ($p<0,05$) para L3 en ambas mezclas, lo que se debió a que la suspensión de esta levadura aportó turbidez, en relación a las otras suspensiones que eran translucidas.
El mayor desarrollo microbiano observado en la mezcla E respecto a la C, puede haberse debido al mayor pH de partida. El pH óptimo de desarrollo de estos microorganismos se encuentra entre 4,5 y 6,5. Además, durante la fermentación las levaduras acidifican el medio debido a una combinación de secreción de protones durante el transporte de nutrientes, secreción directa de ácidos orgánicos (por ejemplo, succinato y acetato), remoción de componentes con capacidad buffer, y producción y disolución del dióxido de carbono (Walker y Stewart, 2016). Para mantener el pH en los rangos óptimos para la actividad de las levaduras se puede incluir en el medio de reacción un buffer fosfato de sodio o potasio. Asimismo, la mezcla E contiene mayor cantidad de nutrientes que provienen del suero (tales como aminoácidos, pequeños péptidos, calcio, manganeso, fósforo, etc.), que son necesarios para el desarrollo de las levaduras y que podrían haber sido el motivo del mejor crecimiento en este medio (Walker y Stewart, 2016).

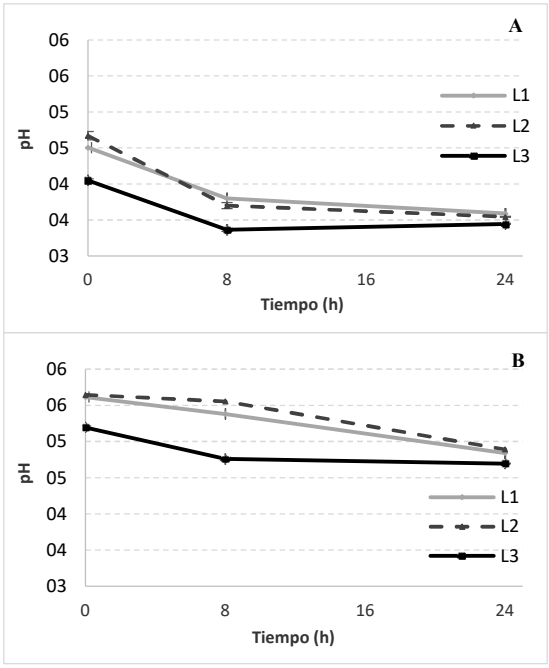


Figura 2. Evolución de pH durante las fermentaciones con levaduras: L1, L2 y L3, de las mezclas C (A) y E (B), incubadas a 30 °C/24h.

Tabla 1. Valor de absorbancia a 600 nm durante la fermentación a 30 °C/24 h. Promedio (*n*= 2) ± desviación estándar.

Mezcla/ Levadura		Tiempo (horas)		
		0	8	24
C	L1	$0,241 \pm 0,016^{B,b}$	$0,298 \pm 0,030^{B,b}$	$0,542 \pm 0,011^{A,b}$
	L2	$0,377 \pm 0,081^{A,b}$	$0,467 \pm 0,088^{A,b}$	$0,539 \pm 0,019^{A,b}$
	L3	$2,645 \pm 0,007^{B,a}$	$2,675 \pm 0,007^{A,a}$	$2,660 \pm 0,001^{A,B,a}$
E	L1	$0,327 \pm 0,054^{B,b}$	$0,713 \pm 0,108^{B,b}$	$1,995 \pm 0,124^{A,b}$
	L2	$0,115 \pm 0,008^{B,c}$	$0,263 \pm 0,057^{B,c}$	$1,985 \pm 0,022^{A,b}$
	L3	$2,572 \pm 0,016^{B,a}$	$2,655 \pm 0,007^{A,a}$	$2,661 \pm 0,023^{Aa}$

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las levaduras a cada tiempo de muestreo y para cada mezcla. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias

significativas para cada levadura con el tiempo de fermentación. Tukey test ($p<0,05$).

Purificación de GOS

La presencia de monosacáridos en preparaciones de GOS se considera indeseable desde el punto de vista del efecto prebiótico buscado, ya que estos monosacáridos no tienen propiedades prebióticas, son absorbidos en el intestino delgados (adicionando valor calórico al producto) y no son fermentados selectivamente, condición esencial para los prebióticos (Goulas *et al*., 2007). Por este motivo, en este trabajo nos propusimos ensayar distintas levaduras *S. cerevisiae* para incrementar el nivel de GOS.

En presencia de algunos azúcares (como glucosa y galactosa) y junto con otros nutrientes esenciales como aminoácidos, minerales y vitaminas, *S. cerevisiae* conducirá el metabolismo fermentativo generando metabolitos de fermentación primarios, etanol y dióxido de carbono, entre otros compuestos secundarios de fermentación (Walker y Stewart, 2016).

A manera de ejemplo, se presenta en la **Figura 3** los cromatogramas superpuestos de la fermentación realizada con la mezcla E y L3 al inicio (0 h) y final (24 h). Se puede observar que la glucosa desapareció completamente, la galactosa disminuyó y la lactosa y GOS se mantuvieron inalterados. Asimismo, se detectó un pico correspondiente al etanol y también se observan otros picos no identificados, pero con valores de áreas muy bajos.

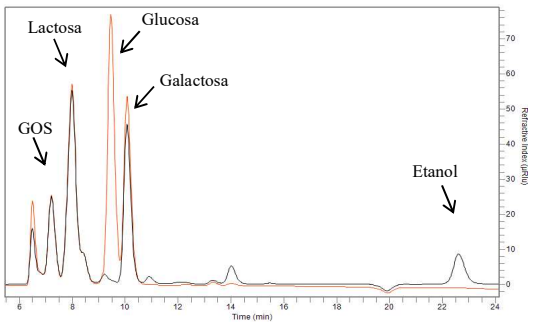


Figura 3. Cromatogramas superpuestos de la fermentación realizada con la mezcla E y L3 al inicio (0 h, rojo) y final (24 h, gris).

Las concentraciones de los carbohidratos durante el proceso de fermentación con las diferentes levaduras para las mezclas C y E, se muestran en la **Figura 4** (**A** y **B**, respectivamente). En C (**Fig. 4A**), las concentraciones de glucosa y galactosa se mantuvieron sin cambios durante todo el periodo de fermentación con L1 y L2. Para L3, ambos monosacáridos disminuyeron ($p<0,05$) a las 8 h: la glucosa fue completamente metabolizada y la galactosa disminuyó un 40% (desde 0,20 g/100 g hasta 0,13 g/100 g), y a las 24 h ambos azúcares desaparecieron. En E (**Fig. 4B**), la glucosa no se modificó hasta las 8 h y disminuyó ($p<0,05$) aproximadamente un 65% a las 24 h para L1 y L2 (desde 5,56 g/100 g hasta 2,05 y 1,94 g/100 g, respectivamente). Para L3, la glucosa disminuyó ($p<0,05$) bruscamente (95%) (desde 5,28 g/100 g hasta 0,25 g/100 g) a las 8 h y continuó disminuyendo hacia el final (aprox. 0,14 g/100 g). La concentración de galactosa se mantuvo constante durante todo el periodo, para L1 y L2; en L3, la galactosa no se modificó hasta las 8 h y luego disminuyó ($p<0,05$) un 17% a las 24 h (desde 3,81 g/100 g hasta 3,15 g/100 g).

En C, los niveles de glucosa y galactosa a las 8 y 24 h fueron similares para L1 y L2, y mayores ($p<0,05$) que los encontrados con L3. En E, se observó un comportamiento similar, con la diferencia que a las 8 h la glucosa para L2 fue mayor ($p<0,05$) a L1.

Para ambas mezclas, los niveles de GOS y lactosa residual no se modificaron con el tiempo, para ninguna de las levaduras ensayadas, indicando que estos azúcares no fueron utilizados como fuente de carbono.

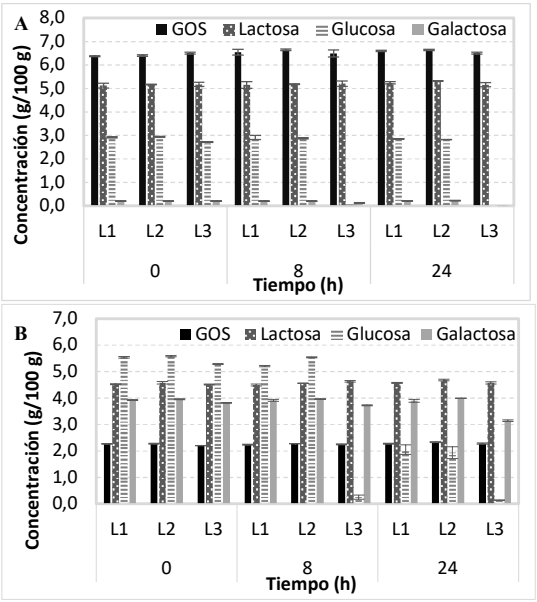


Figura 4. Concentración de carbohidratos durante las fermentaciones con levaduras: L1, L2 y L3 de las mezclas C (A) y E (B), incubadas a 30 °C/24h. Las barras representan la desviación estándar (*n*= 2).

Los niveles de purificación inicial y final con las diferentes levaduras para las mezclas C y E se muestran en la **Figura 5** (**A** y **B**, respectivamente).

Como se mencionó, las fermentaciones de la mezcla C con L1 y L2 no produjeron disminución de ningún carbohidrato, por este motivo no hubo diferencias en los niveles de purificación (P_i, 43,5% y P_f, 44,3%), indicando que en las condiciones ensayadas estos microorganismos no fueron eficientes para purificar la mezcla comercial de

GOS. Un comportamiento diferente se tuvo para L3; los niveles de purificación se incrementaron desde 44,6% hasta 56,0%, debido a la completa desaparición de los monosacáridos, lo que representó un FP de 1,25.

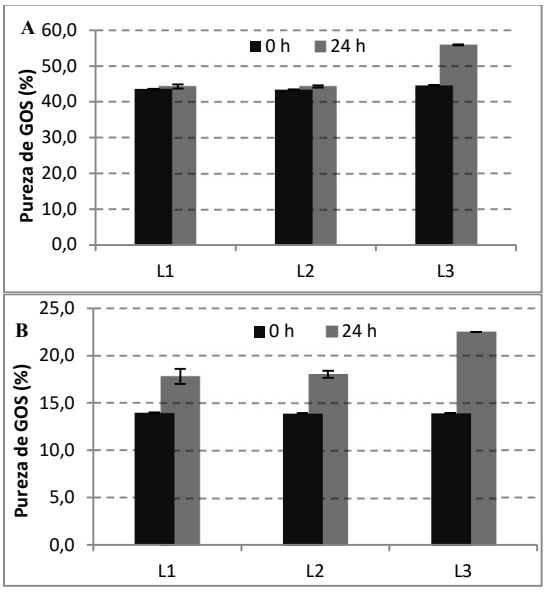


Figura 5. Purificación en las mezclas de GOS C (A) y E (B) con las levaduras: L1, L2 y L3 a 30°C/24h. Las barras representan la desviación estándar (*n*= 2).

Para la mezcla E, se consiguió una purificación parcial de los GOS con todas las levaduras. El nivel de purificación al inicio fue 13,9%, y los niveles finales alcanzados fueron 17,8, 18,0 y 22,5% para L1, L2 y L3, respectivamente, representando valores de FP de 1,27, 1,30 y 1,67, respectivamente. Por otro lado, los mayores niveles de purificación encontrados para L3, se deban probablemente a una mayor actividad de la levadura ya que se trata de una preparación comercial para uso en panificados y que posiblemente posea mayor contenido de nutrientes, comparativamente a L2 y L3 que eran levaduras comerciales purificadas.

Los niveles inalterados de lactosa y GOS observados en este trabajo y la disminución prácticamente total de glucosa fueron similares a aquellos reportados por Goulas *et al*. (2007) y Sangwan *et al*. (2014). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos lograron reducir de manera significativa el contenido de galactosa. Sangwan *et al*. (2014) aplicaron un proceso de purificación posterior para lograr su reducción con *L. helveticus*. Domingues *et al*. (2010) mencionaron que *S. cerevisiae* no puede asimilar la lactosa, pero si puede utilizar la galactosa. De hecho, Yoon *et al*. (2003) lograron la eliminación completa de la galactosa cuando incubaron el azúcar individual con la levadura por 24 h a 37 °C. Sugirieron que es necesario que la levadura se desarrolle en presencia de galactosa como única fuente de carbohidratos, para que se active el mecanismo para su utilización (Sangwan *et al*., 2014). En nuestro trabajo, observamos que la galactosa comenzó a disminuir una vez que el medio estaba libre de glucosa.

4. Conclusiones

La presencia de mono y disacáridos en ingredientes de GOS es altamente indeseable, ya que disminuye el efecto prebiótico entre otros aspectos. En este trabajo se observó que el uso de levaduras para la purificación es un método eficaz para mejorar la calidad del producto, ya que se logró purificar parcialmente las mezclas de GOS tanto comercial como la obtenida experimentalmente a partir de un permeado concentrado en lactosa. Futuros estudios serán llevados a cabo para conseguir mayores niveles de purificación, a través del empleo de otros cultivos microbianos que metabolicen la lactosa, como etapa posterior al uso de levaduras.

5. Referencias

Ackerman, D.L.; Craft, K.M.; Townsend, S.D. (2017). *Infant Food Applications of Complex Carbohydrates: Structure, Synthesis, and Function*, Carbohydrate Research, 437, 16-27.

Amuchástegui, A. (2017). *Estudio de Condiciones Tecnológicas para Obtener un Queso Enriquecido en Galactooligosacáridos,* Tesis de Grado, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Barile, D.; Rastall, R. (2013). *Human Milk and Related Oligosaccharides as Prebiotics*, Current Opinion in Biotechnology 24 (2), 214-219.

Domingues, L.; Guimaraes, P. M. R.; Oliveira, C. (2010). *Metabolic engineering of* Saccharomyces Cerevisiae *for Lactose/Whey Fermentation*, Bioengineered Bugs 1(3), 164-171.

Gómez Soto, J.A.; Sánchez Toro, Ó. J. (2019). *Producción de Galactooligosacáridos: Alternativa Para el Aprovechamiento del Lactosuero. Una Revisión*, Ingeniería y Desarrollo. Universidad del Norte 37(1), 129-158.

Goulas, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R. (2007). *Development of a Process for the Production and Purification of a- and b-Galactooligosaccharides from* Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171, International Dairy Journal 17, 648–656.

Guerrero, C.; Vera, C.; Novoa, C.; Dumont, J.; Acevedo, F.; Illanes, A. (2014). *Purification of Highly Concentrated Galacto-oligosaccharide Preparations by Selective Fermentation with Yeasts*, International Dairy Journal 39(1), 78-88.

Hernández, O.; Ruiz-Matute, A.I.; Olano, A.; Moreno, F.J.; Sanz, M.L. (2009). *Comparison of Fractionation Techniques to Obtain Prebiotic Galactooligosaccharides*, International Dairy Journal 19(9), 531-536.

Johnstone, N.; Milesi, C.; Burn, O.; Bogert, B.; Nauta, A.; Hart, K.; Sowden, P.; Burnet, P.; Kadosh, K. (2021). *Anxiolytic Effects of a Galacto-oligosaccharides Prebiotic in Healthy Females (18–25 Years) with Corresponding Changes in Gut Bacterial Composition*, Scientific Reports 11(1) 8302. Doi: 10.1038/s41598-021-87865-w.

Michelon, M.; Manera, A.P.; Carvalho, A.L.; Maugeri Filho, F. (2014). *Concentration and Purification of Galacto-oligosaccharides Using Nanofiltration Membranes*, International Journal of Food Science & Technology 49(8), 1953-1961.

Moreno, F.J.; Carrero-Carralero, C.; Hernández-Hernández, O.; Sanz, M.L. (2014). *Fractionation of Food Bioactive Oligosaccharides*, Food Oligosaccharides. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 255-283.

Sangwan, V.; Tomar, S.K.; Ali, B.; Singh, R.R.B.; Singh, A.K.; Mandal, S. (2014). *Galactooligosaccharides Purification Using Microbial Fermentation and Assessment of its Prebiotic Potential by In Vitro Method*, International Journal of Current Microbiology Applied Science 3(4), 573-585.

Tokošová, S.; Hronská, H.; Rosenberg, M. (2016). *Production of High-content Galacto-oligosaccharides Mixture Using β-galactosidase and* Kluyveromyces marxianus *Entrapped in Polyvinylalcohol Gel*, Chemical Papers 70 (11), 1445–1451.

.

Torres, D.P.M.; Gonçalves, M.d.P.F.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R. (2010). *Galacto-oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 9(5), 438-454.

Vénica, C.; Bergamini, C.; Perotti, M. (2017). *Response Surface Methodology as a Tool for Modeling the Galactooligosaccharides Production,* Journal of Dairy Research 84(4), 464-470.

Vénica, C.I.; Bergamini, C.V.; Rebechi, S.R.; Perotti, M.C. (2015). *Galacto-oligosaccharides Formation During Manufacture of Different Varieties of Yogurt. Stability Through Storage,* LWT- Food Science and Technology 63, 198–205.

Vénica, C.I.; Wolf, I.V.; Bergamini, C.V.; Perotti, M.C. (2016). *Influence of Lactose Hydrolysis on Galacto-oligosaccharides, Lactose, Volatile Profile and Physicochemical Parameters of Different Yogurt Varieties*, Journal of the Science of Food and Agriculture 96(15), 4929-4939.

Vera, C.; Córdova, A.; Aburto, C.; Guerrero, C.; Suárez, S.; Illanes, A. (2016). *Synthesis and Purification of Galacto-oligosaccharides: State of the Art,* World Journal of Microbiology and Biotechnology 32 (197), 9-20.

Yoon, S.H.; Mukerjea, R.; Robyt, J.F. (2003). *Specificity of yeast (Saccharomyces cerevisiae) in removing carbohydrates by fermentation,* Carbohydrate Research 338(10), 1127-1132.

Walker, G.M.; Stewart, G.G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages*, Beverages 2 (4), 30

16TCA - Caracterización de los distintos estilos de cerveza artesanal de mayor consumo elaboradas en el Partido de Luján Provincia de Buenos Aires.

Characterization of the different styles of craft beer with the highest consumption produced in Luján City, Province of Buenos Aires.

Viviana Panattú[1], Pablo Ojeda[2], Carina Kramer[1], Silvia Calloni[1], Hebe Barrios[2], Silvina Ríos[1]

1. Departamento de Tecnología. Universidad Nacional de Luján.
2. Departamento de Ciencias Básicas**.** Universidad Nacional de Luján. Cruce de rutas 5 y 7, Luján. E-mail: silvina759@gmail.com.

Resumen

El mercado de cerveza artesanal, durante los últimos años, se ha visto incentivado por una creciente demanda a nivel nacional. La amplia heterogeneidad de las características organolépticas de la producción llevada a cabo por los productores bajo distintas condiciones de elaboración limita el análisis y diagnóstico de este sector. El objetivo del trabajo fue evaluar características fisicoquímicas a los diferentes estilos de cerveza artesanal de mayor preferencia por el consumidor. Solo un grupo presentó ligera turbidez. El color expresado en unidades SRM (Standard Reference Method) agrupó a los estilos en Claras (5,48±0,04); Rojizas (21,34±0,02) y Oscuras (36,12±0,01), mientras que en unidades EBC (European Brewery Convention) las clasificó en Claras (7,05–13,23) y oscura (38,9–79,11). El grado de amargor expresado en grado IBU (International Bitterness Units) varió entre 22,16±9,86 y 39,10±10,81 para la menos amarga y más amarga respectivamente. El pH osciló dentro del rango de calidad entre 4-5. Se obtuvo una relación lineal del grado de alcohol determinado a la solución alcohólica del destilado de la cerveza por picnometría, versus al determinado con alcoholímetro. En conclusión, las cervezas se caracterizaron por presentar diferencia en color y alcohol, ausencia de turbidez y coincidieron en el resto de los parámetros analizados.

Palabras clave: Cerveza artesanal, color, turbidez.

Abstract

The craft beer market, in recent years, has been encouraged by a growing demand at the national level. The wide heterogeneity of the organoleptic characteristics of the production carried out by the producers under different production conditions limits the analysis and diagnosis of this sector. The objective of this work was to evaluate physicalchemical characteristics of craft beer to different styles of greater consumer preference to describe the trend in the Luján area. Only one group presented slight turbidity. The color expressed in SRM (Standard Reference Method) group the styles in Lights (5,48±0,04); Reddish (21,34±0.02) and Dark (36,12±0,01), while in EBC (European Brewery Convention) units classify that as Light (7,05-13,23) and Dark 38,9-79,11. The degree of bitterness expressed in IBU (International Bitterness Units) varied between 22.16±9.86 and 39.10±10.81 for the least bitter and most bitter respectively. The pH oscillates within the quality range between 4-5. A linear relationship was obtained from the degree of alcohol determined to the alcoholic solution of the beer distillate by pycnometry versus alcoholmeter. In conclusion, the beers were characterized by presenting a difference in color and alcohol, absence of turbidity, and they coincided in the rest of the parameters analyzed.

Keywords: Craft beer, color, turbidity

1. Introducción

En el artículo 1080 del Código Alimentario Argentino se define como cerveza a la bebida resultante de fermentar, mediante levadura cervecera, al mosto de cebada malteada o de extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionado de lúpulo. Una parte de la cebada malteada o de extracto de malta podrá ser reemplazada por adjuntos cerveceros (CAA, 2018). Según datos de la Cámara de la Industria Cervecera Argentina, en los últimos veinte años se consumió en promedio 41 litros de cerveza por habitante y por año, con un máximo en el año 2011 de 45 litros per cápita y un mínimo en el año 2000 de 34 litros/hab./año (Paollili *et al.*, 2021).

Con la devaluación del peso argentino en el año 2002, el ingreso de las cervezas importadas se redujo notablemente, lo que obligó a la industria nacional generar otras alternativas para los consumidores más exigentes en cuanto al sabor y a la calidad. Además, las cervecerías artesanales brindan alternativas a los consumidores de productos de alta calidad y una gran variedad de estilos, a diferencia de las grandes industrias que ofertan un producto altamente masificado y con opciones reducidas (Vuotto y Natapof, 2011). Esto posibilitó a que, los productores artesanales existentes, incrementen su producción rápidamente y a su vez incentiven la incorporación de nuevos elaboradores, aumentando las alternativas de sabor y calidad en el mercado.

La producción en nuestro país de cerveza artesanal se calcula que creció una media de 40% en los últimos cinco años, comprendiendo más de 1.500 productores cerveceros artesanales. La categoría representa cerca del 2,5 % de la industria cervecera (Risso, 2018). En el partido de Luján el crecimiento de emprendimientos de cervezas artesanales fue en aumento, y no se dispone de antecedentes relacionados al estudio de estandarización de la calidad del producto que se comercializa. A continuación, se nombran algunos parámetros fisicoquímicos usados comúnmente para describir una cerveza, los cuales pueden ser medidos convenientemente en la tarea de asegurar la calidad.

La turbidez, la cual es provocada por partículas en suspensión, que reflejan la luz. Tales partículas pueden ser, entre otras, las células de levadura, las proteínas y los taninos (polifenoles), que son los principales causantes de los problemas de claridad. La turbidez también depende del estilo de cerveza que se elabore. Esta característica es muy importante, ya que afecta a la calidad de la cerveza. Pues influye mucho en el consumidor debido a que una cerveza turbia se suele relacionar con un producto en mal estado (Álvarez, 2020).

El color de estos productos es uno de los atributos sensoriales más importantes, ya que tiene que ser fiel al tipo de cerveza, pues es la primera propiedad que observa el consumidor (Koren, 2020). El color del producto final se debe principalmente a las diferentes materias primas utilizadas durante el proceso de elaboración de la cerveza. Depende especialmente de los granos y los procesos, principalmente el tostado, que estos granos han sufrido (Davies, 2016).

El contribuyente secundario, es la oxidación de los polifenoles, procedentes de la malta y el lúpulo, durante el almacenamiento y el envejecimiento. Los principales componentes fenólicos que contribuyen a los cambios de color de la cerveza debido a la oxidación son los monómeros flavan-3-ol y los oligómeros de proantocianidina (Aron y Shellhammer, 2010). Otro ejemplo, de reacciones que contribuyen al color, es la conocida reacción de Maillard entre el grupo amino y el grupo del azúcar.

El método, para determinar color, por observación directa, es un método subjetivo que depende en gran medida de la visión del examinador. Asimismo, con el auge de la elaboración de cerveza artesanal y con la ampliación de diversidad de colores de las mismas. La variación natural en la percepción de los colores de una persona a otra, puso en evidencia las limitaciones del método subjetivo. Esto condujo a la necesidad del uso de determinaciones instrumental de color, métodos de medición específicos, como los basados en la absorbancia (Koren *et al.*, 2020).

El amargor es uno de los cuatro sabores básicos y una característica deseable en toda cerveza. La causa de amargor, es resultado de la solución de los iso-α-ácidos de los lúpulos en el mosto durante la cocción. La intensidad y la calidad del amargor depende de la elección de la variedad de los lúpulos, el contenido de α-ácidos o a veces la cantidad de β- ácidos oxidados que dan un tipo de amargor suave (Suárez Díaz, 2013). Los métodos para determinar amargor se basan en extracción líquido - líquido de los compuestos químicamente semejantes a los α-ácidos y su cuantificación por espectrofotometría (AOAC, 2000).

Uno de los aspectos más importantes es conocer el grado de alcohol que se forma durante la etapa de fermentación del mosto (proceso anaeróbico), mediante el cual la levadura convierte la glucosa en etanol y dióxido de carbono. Uno de los métodos más comunes que utilizan los cerveceros para medir el contenido de alcohol en la cerveza es estimarlo a través de la densidad del mosto antes y al final de la

fermentación. Se trata de un proceso complejo, que los maestros cerveceros deben dominar para hacer la cerveza de su preferencia (Cámara de la cerveza, 2018). El valor obtenido es aproximado al real. Pues el contenido de alcohol se determina midiendo la densidad por picnometría a la solución alcohólica obtenida por la destilación de la cerveza (AOAC, 2000).

El objetivo del presente trabajo se centró en comenzar a caracterizar los distintos estilos de cerveza artesanal de mayor consumo elaborados en Luján, mediante parámetros fisicoquímicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Recolección y preparación de las muestras

Se eligió al azar el 70% del total de los elaboradores de cerveza artesanal del partido de Luján. La recopilación de las muestras comerciales consistió en cumplir el criterio de seleccionar entre la diversidad de estilos de cerveza artesanal, aquellos estilos que fueran los más elegidos por los consumidores. Se consultó al productor para seleccionar la muestra que cumpla el criterio y se recolectó 1 litro de cerveza artesanal, tal cual se comercializa, se agruparon por estilos y a cada grupo se le asignó un código numérico. Las muestras de cervezas se mantuvieron refrigeradas (4°C) hasta su análisis.

2.2. Características fisicoquímicas

Turbidez y color se determinaron mediante las absorbancias con un espectrofotómetro UV Visible Shimadzu UV 1800 con cuba de cuarzo de 500 µL, (paso de luz: 1cm). Para determinar turbidez se registró los valores de absorbancia a 430 y 700 nm. Con la ecuación (1) se corrigió la absorbancia medida a 430 nm (Ab_c)

$$Ab_c = Ab_{430\ nm} * 0.039 \qquad (1)$$

Si (Ab_c) resulta ser mayor e igual a la Absorbancia que se registró a 700 nm, entonces es indicativo de presencia de turbidez (AOAC, 2000)

Para la determinación de color, se trabajó con cerveza previamente descarbonatada y las muestras turbias se debieron filtrar por gravedad con papel de filtro 0,45 µm. Se registró la absorbancia a una longitud de onda de 430 nm y se calculó el color con la ecuación (2) (AOAC, 2000)

$$Color = Ab_{430nm} * 10 \qquad (2)$$

El color se expresó en unidad SRM (Standartd Reference Method) y se realizó la conversión en unidades de EBC (European Brewery Convention). Con los datos de color obtenidos se estableció la clasificación de las cervezas. Se utilizó los rangos de color que propone la guía de estilos Beer Judge Certification Program (BJCP, 2015) y la clasificación que establece el Código Alimentario Argentino en unidades de EBC.
El amargor se determinó mediante el método químico según AOAC, (2000). Se extrajo iso-alfa ácidos disueltos en 2,5 mL de cerveza gasificada con 5,0 mL de isooctano (2,2,4- Trimetilpentano) en un medio acidificado con 0,250 mL de HCL 3N. Se mezcló por inversión (30 veces) y durante 1 minuto con un vortexmixer Sepeed Knob 1500. Luego se centrifugó para separar las fases a una velocidad de 3500 rpm durante 15 minutos. Finalmente se midió la absorbancia de la fase orgánica a 275 nm utilizando un espectrofotómetro UV Visible Shimadzu UV 1800 con cuba de cuarzo de 500 µL. Se calculó el amargor con la ecuación (3). Los resultados se expresaron en unidades de amargor °IBUs (International Bitternes Units)

$$Amargor\ (IBU) = A_{275nm} * 50 \qquad (3)$$

El pH de 20 ± 0,1 mL de muestra sin diluir y descarbonizada mediante agitación suave, se midió a temperatura de 18 $\pm$ 2°C con un pH-metro digital VEGA V*N (Parsec Instrumental Científico, Ciudadela, Argentina) previamente calibrado a 4,0 y 7,0 con soluciones buffer (AOAC, 2000)

Los sólidos solubles, entre ellos azúcares, disueltos en la cerveza se determinaron con un refractómetro de mano (Alla France -ATC) calibrado a 20°C y los resultados se expresaron en °Brix sólidos solubles que poseen igual índice de refracción que una solución de sacarosa % m/m (AOAC, 2000). Es importante entender, como dice Eizaguirre y Libkind (2017) en la Guía para uso de refractómetro en cervecería para determinación rápida de densidad, atenuación y alcohol, que es una medida indirecta de los azúcares y que otros compuestos (ej. alcohol) pueden modificar el índice, pero aun así es muy útil.

Para determinar el grado de alcohol en cerveza se utilizó dos procedimientos de medición. Se destiló 200 mL de cerveza previamente desgasificada y filtrada por gravedad con papel de filtro 0,45 µm, se recolectó 100 mL del destilado. El contenido de alcohol del destilado se midió por dos métodos: a) A los 100 mL de destilado se lo trasvasó a matraz de 200 mL y se enrasó con agua destilada. Se midió la densidad a 20°C/20°C con un picnómetro aforado de 50 mL. Se calculó la densidad del destilado con la ecuación (4). Se utilizó la tabla del Anexo I de

Resolución C. 18/99 para calcular, a partir de la densidad del destilado, la graduación alcohólica y se expresó el % de alcohol por volumen del destilado (AOAC, 2000). b) Se utilizó un alcoholímetro de Gay-Lussac a 20°C y se midió a 100 mL del destilado el grado de alcohol y se expresó en porcentaje de alcohol en el destilado. Se estudió, si existía correlación entre ambos procedimientos de medición.

$$\text{Densidad de destilado a } 20 \pm 0.5°C = \frac{(P_3 - P_1)}{(P_2 - P_1)} \quad (4)$$

Referencia:
P_1: Peso en g de picnómetro vacío a T 20°C.
P_2: Peso en g del picnómetro lleno de agua destilada a T 20°C
P_3: Peso en g del picnómetro lleno del destilado de cerveza a T 20°C

2.3 Análisis estadístico

Todas las mediciones fueron realizadas al menos por duplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. Se realizó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas a $P < 0,05$.

3. Resultados y Discusión

En la tabla N°1, se muestran la absorbancia de 430 nm corregidas (Ab_c) y las absorbancias a 700 nm que se registraron para evaluar presencia o ausencia de turbidez.
Como puede observarse en la tabla N°1, las absorbancias a 700 nm son mayores a las absorbancias corregidas medida a 430 nm (Ab_c), lo cual indicó ausencia de turbidez en las cervezas.
Mientras que la muestra 111, reflejó lo contrario absorbancia menor a 700 nm, reveló una ligera turbidez que no se percibió visualmente.

Tabla N°1: Determinación de turbidez en cervezas.

Muestras	Ab (c)	Ab (700 nm)
104	0,077	0,374
105	0,084	0,132
106	0,250	0,383
107	0,020	0,054
108	0,125	0,204
109	0,024	0,112
110	0,041	0,047
111	0,017	0,014
112	0,026	0,090
113	0,014	0,023

En la Tabla N°2 se muestran los valores promedio de color con sus desvíos estándar obtenidos de las cervezas artesanales

Tabla N°2: Valores promedio de color con sus desvíos estándar en unidades SRM y EBC

Muestras	Color (SRM)	Color (EBC)
104	19,77 $\pm$ 0,01^{g}	38,96 $\pm$ 0,14^{g}
105	40,15 $\pm$ 0,01^{j}	79,11 $\pm$0,14^{j}
106	6,47 $\pm$ 0,01^{e}	12,76 $\pm$ 0,14^{e}
107	5,68 $\pm$ 0,01^{c}	11,20 $\pm$ 0,14^{c}
108	32,09 $\pm$ 0,01^{i}	63,23 $\pm$ 0,14^{i}
109	6,15 $\pm$ 0,01^{d}	12,13 $\pm$ 0,14^{d}
110	22,92 $\pm$ 0,03^{h}	45,15 $\pm$ 0,05^{h}
111	4,29 $\pm$ 0,14^{b}	8,45 $\pm$ 0,02^{b}
112	6,71 $\pm$ 0,07^{f}	13,23 $\pm$ 0,01^{f}
113	3,58 $\pm$ 0,01^{a}	7,05 $\pm$ 0,01^{a}

Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes a $p < 0,05$

Se observa en la tabla N°2 que, entre los estilos de cerveza artesanal, hay diferencia significativa a ($p < 0,05$) para el color. No obstante, se agruparon los diferentes estilos en tres grupos por color según la guía de estilos Beer Judge Certification Program (BJCP, 2015) en, muestras claras: 113, 111, 107, 109, 106, 112 (Figura 1), muestras rojizas: 104 y 110 (Figura 2) muestras oscuras: 108 y 105 (Figura 3) cuya media en unidades de SRM respectivas fueron: 5,48 $\pm$ 0,04; 21,34 $\pm$ 0,02 y 36,12 $\pm$ 0,01.

En unidades E.B.C. como indica el CAA se clasifican en dos grupos Cerveza clara aquellas cuyo color es inferior a 20 unidades E.B.C y corresponde a las muestras 113, 111, 107, 109, 106 y 112 (Figura 4) mientras que a valores superiores a 20 unidades de E.B.C. pertenece a las cervezas oscura o negra siendo estas muestras 104, 110, 108 y 105 (Figura 5). El rango de color en EBC para la clasificación de cervezas clara se encuentra entre 7,05 – 13,23 EBC y para las cervezas oscuras el rango comprende entre 38,9 – 79,11 EBC.

Figura 1: Cervezas artesanales claras clasificadas por color expresado en SRM según guía de estilos Beer Judge Certification Program

Figura 2: Cervezas artesanales rojizas clasificadas por color expresado en SRM según guía de estilos Beer Judge Certification Program.

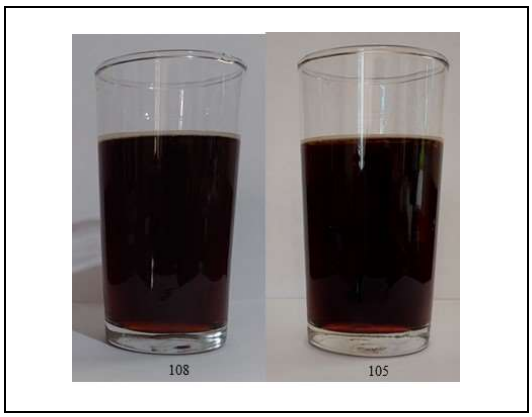


Figura 3: Cervezas artesanales oscuras clasificadas por color expresado en SRM según guía de estilos Beer Judge Certification Program.

Figura 4: Clasificación de las cervezas artesanales por color expresado en EBC según Código Alimentario Argentino: Cervezas Claras

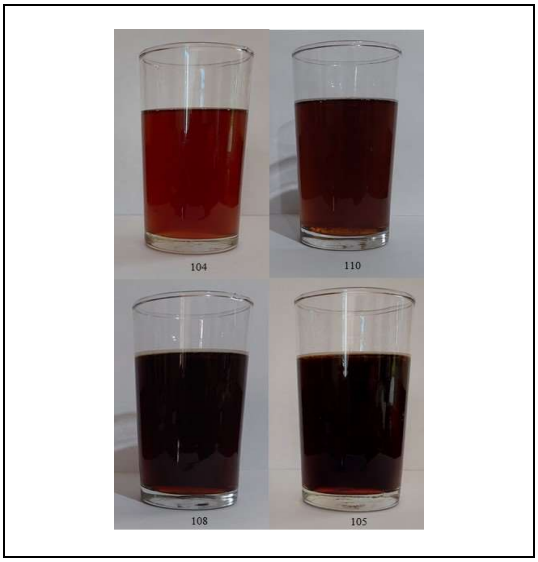


Figura 5: Clasificación de las cervezas artesanales por color expresado en EBC según Código Alimentario Argentino: Cervezas Oscuras

En la tabla N°3, se presentan los valores promedio y desvío estándar de los parámetros fisicoquímicos correspondientes a los distintos grupos de cerveza.

El amargor en la cerveza artesanal, no reveló estadísticamente diferencias significativas entre los grupos de clasificación por color según unidades SRM (clara: 22,16, rojizas: 23,38 y oscuras: 39,10) y tampoco hubo diferencia para los grupos en unidades EBC (claras 22,16 y oscura: 31,24). La aparición de características amargas y aromáticas en la cerveza está

fuertemente relacionada con la composición química del lúpulo, la cantidad añadida, el tipo de lúpulo y el momento de la dosificación del lúpulo al mosto (Rettberg *et al.*, 2018).

Tabla N° 3: Resultados promedio con sus desvíos estándar de amargor, pH, °Brix y porcentaje de alcohol de cerveza clasificadas en grupos por color en unidades SRM y EBC

	Clasificación por unidad de color				
	SRM			EBC	
	Clara	Rojiza	Oscura	Clara	Oscura
Amargor (IBU)	22,16± 9,86 [a]	23,38 ± 3,02[a]	39,10± 10,81 [a]	22,16± 9,86 [a]	31,24± 10,81 [a]
pH	4,31± 0,30 [a]	4,05± 0,02 [a]	4,35± 0,05 [a]	4,31± 0,30 [a]	4,20± 0,16 [a]
°Brix	5,88± 0,59 [a]	5,75 ± 0,85[a]	6,17± 0,78 [a]	5,88± 0,59 [a]	5,96± 0,79 [a]
Alcohol (%)	4,21± 0,51 [a]	3,86± 0,20 [a]	4,91± 0,29 [b]	4,21± 0,51 [a]	4,38± 0,28 [a]

Valores en la misma fila con diferente superíndice son significativamente diferentes a $p < 0,05$

El pH es un factor importante en la fermentación, debido al control que ejerce frente a la contaminación bacteriana, así como frente al crecimiento de la levadura, la velocidad de fermentación y la producción de alcohol.
Los valores obtenidos de pH que se muestran en la tabla N°3, no reflejaron estadísticamente diferencias significativas entre los grupos clasificados por color según unidades de SRM y tampoco para el caso de los grupos en unidades EBC. Según el Código Alimentario Argentino en su artículo 1082, referido a cerveza, establece un valor de pH entre de 4 - 5, por lo cual los obtenidos experimentalmente cumplen con la normativa vigente (CAA, 2018).

La concentración de azúcares residuales en la cerveza, puede dar indicios de la eficiencia de la fermentación. Valores superiores a 8 °Brix, sugiere una fermentación deficiente, mientras que una súper-atenuación, valores por debajo de 4 °Brix, puede sugerir la presencia de contaminantes ya que las levaduras cerveceras no son capaces de fermentar (Suárez Díaz, 2013). La tabla N°3, muestra que entre los grupos clasificados por color según unidades de SRM y EBC no revelaron estadísticamente diferencia significativa en °Brix (5,95). Las cervezas artesanales analizadas reflejaron una fermentación adecuada.

El porcentaje medio de alcohol por picnometría, en tabla N°3, muestra que según clasificación de las cervezas por color en unidades SRM, las claras (4,21%) y rojizas (3,86%) no presentaron estadísticamente diferencias significativas, mientras que la oscura (4,91%) reveló ser diferente con un contenido mayor de alcohol. Y según clasificación de las cervezas por color en unidades EBC entre claras y oscuras no revelaron estadísticamente diferencias significativas para el contenido medio de alcohol. Por presentar las muestras analizadas un nivel de alcohol menor del 6% se supone, según la guía de estilos Beer Judge Certification Program (BJCP, 2015), que no tienen características de sabor o tibieza por alcohol, a menos que se indique lo contrario en el rótulo.

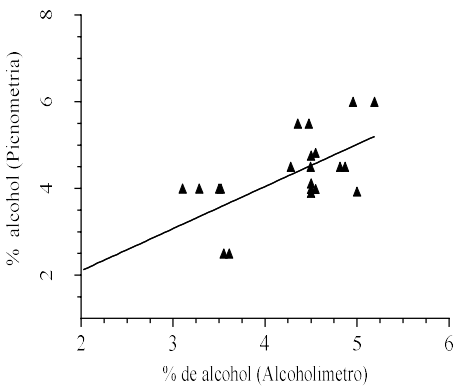


Figura 6: Porcentaje de alcohol medido por picnometría versus Alcoholímetro

Al analizar los datos obtenidos referentes a grado alcohólico en el gráfico de figura 6, se observa que existe una relación lineal directa (5) entre el alcohol del destilado medido por picnometría (Y) versus alcohol medido con alcoholímetro de Gay Lussac (X). Cuyo $R^2 = 0,9738$

$$Y = 1,0201 * X \qquad (5)$$

El grado alcohólico real determinado por picnometría del destilado es mayor que el determinado por el densímetro (alcoholímetro). Esto se debió a que, el alcoholímetro Gay Lussac que se utilizó de escala 0-40, no sería el más adecuado para los niveles de alcohol presente en la cerveza.

4. Conclusiones

Se concluye que los estilos de cervezas artesanales de mayor consumo se caracterizaron por no presentaron turbidez. Con respecto al color existió estadísticamente diferencias significativas de color. Se clasificaron según unidades de color SRM: en clara (5,48 ± 0,04) y), rojizas (21,34 ± 0,02) y oscura (36,12 ± 0,01). Siguiendo la escala en unidades EBC: Claras (10,80 ± 0,014) y oscuras (56,61 ± 0,18). Las cervezas oscuras de ambas clasificaciones presentaron mayor contenido de alcohol. Para el resto de los parámetros analizados, amargor (27,60 ± 1.60 IBU), pH (4,24 ± 0.23) y °Brix (5,93 ± 0.68) no existió diferencias significativas entre la clasificación por color según unidades SRM y EBC respectivamente. Este estudio indicó que el consumidor selecciona el estilo de cerveza artesanal por color y contenido de alcohol. Los valores de los parámetros analizados se podrían tomar como referencia para cualquier estilo de cerveza artesanal que se elabore en la zona de Lujan.

5. Referencias

Álvarez Aránzazu Valverde. (2020) *Manual de análisis para el control de calidad de la cerveza en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.* Universidad de Sevilla. España.

AOAC, (2000) AOAC *Official Method of analysis* (17th ed) Arligton, USA.

Aron PM, Shellhammer TH (2010*) A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability.* J Inst Brew 116 (4) :369–380
Beer Judge Certification Program (BJCP). (2015). *Guía de estilos de cerveza.* St. Louis Park, Minnesota. 103 pp.

Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y de la Malta. (2018) Cerveceros de México Revisado el 14/10/2021. Disponible: https://cervecerosdemexico.com/quienes-somos-cerveceros-mexico/

Código Alimentario Argentino Capítulo XIII Bebidas Fermentadas. Actualizado al 12/2018. Consultado: 16/09/2021. Disponible: https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario

Davies N (2016) *Maltas. En: Bamforth CW (ed) Materiales y procesos de elaboración de cerveza*. Elsevier, Ámsterdam, pp 1-25.

Eizaguirre J. I. y Libkind D. (2017) Guía para uso de refractómetro en cervecería para determinación rápida de densidad, atenuación y alcohol

Instituto Nacional de Vitiviniculatura. (1999) Resolución C. 18/99. Revisado 06/2/202. Disponible: https://www.servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/55000-59999/59671/norma.htm

Koren D, Hegyesné Vecseri B, Kun-Farkas G, Urbin Á, Nyitrai Á, Sipos L. (2020) ¿Cómo determinar objetivamente el color de la cerveza? J Food Sci Technol.2020;57(3):1183-1189. doi:10.1007/s13197-020-04237-4

Paollili M.C., Cabrini S.M., Fillat F.A., Pagliaricci L.O. (2021) *Estructura de la Cadena de Cebada en Argentina.* Revisado el 30/11/2021 Disponible: https://inta.gob.ar/documentos/indicadores-economicos-e-informes-tecnicos

Rettberg, N.; Biendl, M.; Garbe, L. (2018). *Hop Aroma and Hoppy Beer Flavor: Chemical Backgrounds and Analytical Tools*—A Review. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 76:1, 1-20, DOI: 10.1080/03610470. 2017.1402574.

Risso, Natalí (01/08/2018) "*La cerveza artesanal gana terreno: proyecciones del negocio de moda*", Diario El Cronista [en línea]. Revisado: 30/11/2021.Disponible: https://www.cronista.com/pyme/negocios/Cerveza-artesanal-un-mercado-efervescente-que-crecio-40---20180801-0003.html

Suarez Díaz M. (2013) *Cervezas: componentes y propiedades.* Tesis de Master Universitario en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. España.88pp.

Vuotto, P. y Natapof, D. (2011). *Diagnóstico Sectorial Cervecerías Artesanales Región Andina, Bariloche y Comarca Andina*. CREAR. 1-55.

17TCA - Caracterización química de vinos Malbec y Cabernet franc provenientes de dos localidades de La Pampa (Argentina), en relación al grado de madurez de las uvas

Chemical characterization of Malbec and Cabernet franc wines from two locations in La Pampa (Argentina) in relation to grapes ripeness degree.

Ayelén Varela[1,2], Luján Masseroni[2], Santiago Sari[3], Jorge Prieto[3], Paolo Sartor[2], Damián Zamora[2], Dardo Fontanella[2], Carolina Aumassanne[2], Martín Fanzone[3].

1. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290, Buenos Aires, Argentina
2. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), AER 25 de mayo. Gral. Pico 720, 25 de mayo, La Pampa, Argentina.
3. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - EEA Mendoza. San Martín 3853, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.
E-mail: varela.ayelen@inta.gob.ar

Resumen

Este trabajo tiene como objetivos, caracterizar la composición química de uvas y vinos de las variedades Malbec y Cabernet franc provenientes de 25 de Mayo y Casa de Piedra (La Pampa, Argentina) e interpretar la influencia del grado de madurez de las uvas sobre la composición química de los vinos de estas variedades tintas. Las uvas se cosecharon en dos momentos: Madurez 1 (M1: 35 días después del envero) y Madurez 2 (M2: 50 días después del envero), en 2020 y 2021. Se determinaron componentes del rendimiento (producción, peso de racimos y de baya), parámetros generales analíticos en los mostos de uvas (°Brix, pH y acidez titulable) y en los vinos (alcohol, pH, acidez titulable y volátil) y compuestos fenólicos globales (fenoles, antocianos, taninos y pigmentos poliméricos). Las uvas de la M2 tuvieron mayores valores de sólidos solubles y pH y menor acidez titulable. En los vinos, la M2 mostró mayor concentración de polifenoles globales, mayor pH y contenidos de etanol más elevados. Al comparar las zonas, los vinos producidos en 25 Mayo tuvieron significativamente mayores contenidos de polifenoles en general, demostrando un mayor potencial enológico que Casa de Piedra.

Palabras clave: La Pampa, grado de madurez, vinos, compuestos fenólicos.

Abstract

The present study aimed to both, characterize the chemical composition of Malbec and Cabernet franc grapes and wines from 25 de Mayo and Casa de Piedra (La Pampa, Argentina), and to evaluates the influence of the grapes ripeness degree on the chemical composition of these red wines. The grapes were harvested in two moments: Maturity 1 (M1: 35 days after veraison) and Maturity 2 (M2: 50 days after veraison), in 2020 and 2021. In grape, yield components (production, bunch and berry weight) and general analytical parameters (° Brix, pH and titratable acidity) were determined. In wines, general analytical parameters (alcohol, pH, titratable and volatile acidity) and global phenolic compounds (phenols, anthocyanins, tannins and polymeric pigments) were analyzed. The M2 grapes had higher soluble solids and pH values and lower titratable acidity. The M2 wines showed a higher concentration of global polyphenols as well as higher pH and ethanol content. Moreover, when the zones were compared, the 25 de Mayo wines showed significantly higher polyphenol content in general, demonstrating better oenological potential than Casa de Piedra.

Keywords: La Pampa, ripeness degree, wine, phenolic compounds.

1. Introducción

La Región Patagónica Argentina es una de las regiones vitivinícolas más australes (38º a 45º de latitud sur) y con menor altitud del mundo. La viticultura se asienta principalmente en los márgenes de los ríos Negro y Colorado, en las provincias de Neuquén, La Pampa y Río Negro, aunque también se cultiva vid en regiones de la provincia de Chubut. Debido al avance de la tecnología de riego, la frontera del cultivo de la vid en la región se ha extendido y puede propagarse a niveles incalculables, a partir de la utilización de los suelos de la meseta patagónica (Villareal et al., 2007).

Particularmente, en la provincia de La Pampa, según las últimas estadísticas del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, 2020), la actividad vitícola ha crecido considerablemente luego del año 2000. Desde 2010, la superficie total ha aumentado un 32% (+ 68 ha). Además, presenta un 99,8% de su superficie con variedades aptas para elaboración de vinos y/o mostos.

La viticultura pampeana se desarrolla en la cuenca media del rio Colorado, al sur de la provincia. El clima es árido al oeste y semiárido al este con temperaturas medias anuales de 15°C y una amplitud térmica anual muy marcada de 17°C. El régimen de lluvias disminuye de este a oeste, observándose precipitaciones medias anuales que varían desde los 320 a los 260 mm. Los suelos son pobres en materia orgánica y predominantemente arenosos con buen drenaje (Aumassanne, 2019). Estas características otorgan al cultivo un sitio vitícola óptimo para la producción de vinos de alta calidad.

Actualmente, la tendencia del mercado del vino tinto se encuentra orientada hacia la elaboración de productos con un alto contenido polifenólico y complejidad aromática, es por ello que resulta fundamental la comprensión de estos parámetros de calidad y de los múltiples factores que inciden sobre los mismos.

Los compuestos fenólicos representan unos de los principales metabolitos secundarios presentes en las uvas, y según su estructura química pueden ser divididos en dos grandes grupos: no-flavonoides (ácidos fenólicos y estilbenos) y flavonoides (antocianinas, flavanoles y flavonoles) (Ribéreau–Gayon et al., 2003). Las antocianinas constituyen la familia de compuestos directamente responsables del color de las uvas y vinos tintos jóvenes, los flavanoles (monómeros, oligómeros y polímeros) contribuyen a la astringencia, amargor y estructura de los vinos (Gawel, 1998), por su parte, los flavonoles se relacionan con el amargor (Sáenz-Navajas et al., 2010) y junto con los flavanoles participan del color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación (Monagas et al., 2005).

La biosíntesis y acumulación de los compuestos fenólicos durante las distintas fases del desarrollo de las bayas, depende tanto del genotipo de la planta como también de diversos factores bióticos (microorganismos estimulantes o antagonistas), abióticos (condiciones edafoclimáticas), y de las prácticas culturales realizadas en el viñedo (Düring y Davtyan, 2002; Downey et al., 2006; Villareal et al., 2007; Ubalde et al., 2007; Gutiérrez-Escobar, 2021).

Por otro lado, resulta esencial determinar el grado de madurez de las uvas (hollejo, semilla y pulpa) que permitirá definir el momento oportuno de cosecha, con el mejor potencial de calidad, para producir el vino de las características buscadas. Es decir, determinar cuál es el contenido de azúcar en las bayas que permita obtener, a su vez, la madurez fenólica, término que abarca no sólo la abundancia, diversidad y complejidad de los distintos compuestos presentes en las uvas, sino también su extractabilidad desde las distintas partes de la baya hacia el vino durante el proceso de vinificación (Ribéreau–Gayon et al., 2003).

Si bien existen resultados acerca del impacto de los factores antes mencionados, sobre la composición química de uvas y vinos de diversas zonas vitícolas de Argentina, particularmente Mendoza (Fanzone, 2012), no se cuenta con información científica sobre la zona de estudio. Es por esto que se propone con este trabajo, generar información científica de base que permita, por un lado, caracterizar la composición química de uvas y vinos de las variedades Malbec y Cabernet franc provenientes de distintas localidades de la cuenca media del río Colorado (La Pampa, Argentina); y por otro lado, interpretar la influencia del grado de madurez de las uvas sobre la composición química de los vinos de estas variedades tintas.

A partir de estos objetivos, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo: la composición química de los vinos de las variedades Malbec y Cabernet franc de la cuenca media del río Colorado presentan un alto potencial de calidad, representado por un alto contenido de polifenoles. Así mismo, la cosecha temprana de uvas permite obtener vinos con mayor cantidad de polifenoles y mejores características químicas generales, lo que favorece a la estabilidad de los mismos.

2. Materiales y métodos

Material Vegetal

El ensayo fue realizado durante las vendimias 2020 y 2021 con uvas Malbec y Cabernet franc provenientes de viñedos ubicados en dos localidades (25 de Mayo, Casa de Piedra) de la

cuenca media del río Colorado (La Pampa, Argentina).

En el viñedo de la localidad de 25 de Mayo (67º 42' O y 37º 52' S), la variedad Malbec fue implantada en 2003 y Cabernet franc en el año2008, ambas sobre pie franco con un sistema de conducción en espaldero con orientación Norte-Sur, poda corta en cordón bilateral pitoneado y riego por goteo. El marco de plantación, en ambas variedades, es de 2 m entre hileras y 1,5 m entre plantas.

En el viñedo de la localidad de Casa de Piedra (67º 08' O y 38º 09' S) ambas variedades fueron implantadas en 2011 sobre pie franco con igual conducción, poda y riego que en 25 de Mayo. El marco de plantación, en ambas variedades, es de 2,2 m entre hileras y 1 m entre plantas.

En ambos viñedos, la producción estimada fue de 9.000 kg/ha para Malbec y 10.500 kg/ha para Cabernet franc, mediante el ajuste de carga en la poda invernal y posteriormente con desbrotes.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, consistente en tres unidades experimentales de 10 plantas al azar para cada variedad, en cada zona, teniendo en cuenta el perímetro de tronco para determinar uniformidad de las plantas.

Las uvas se cosecharon en dos momentos: Madurez 1 (M1: 35 días después del envero) y Madurez 2 (M2: 50 días después del envero). En ambas temporadas se emplearon tres réplicas de cada momento.

Las vinificaciones se realizaron a escala piloto en recipientes plásticos grado alimentario (30 L,) siguiendo un protocolo estándar de vinificación. En ambas temporadas se evaluaron los vinos al momento de embotellado (60 días después post-embotellado).

Determinaciones analíticas

Se determinaron componentes del rendimiento como la producción por planta y el peso de racimos en cada vendimia y se realizó un muestreo de 100 bayas para determinar el peso de baya. Luego de la molienda, se determinaron parámetros generales analíticos (°Brix, pH y acidez titulable) en los mostos de cada unidad experimental.

En los vinos se procedió a la determinación de parámetros analíticos generales (alcohol, pH, acidez titulable y volátil), siguiendo la metodología de la OIV (OIV, 2017); y compuestos fenólicos globales (fenoles, antocianos, taninos y pigmentos poliméricos), por espectrofotometría UV-Visible (Harbertson et al., 2003; Gordillo et al., 2015).

Análisis estadístico de los datos

Se verificó normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas por el test de Levene's. Se realizó el análisis de la varianza de dos vías (ANOVA) y la comparación de medias por el test de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05. Valores de $p<0,05$ indicaron diferencias significativas. Todos los análisis se realizaron empleando los programas estadísticos Jamovi (2021) e Infostat (2020).

3. Resultados y Discusión

Parámetros de rendimiento

Está claro que el rendimiento influye en la calidad de las uvas y sus vinos, pero se trata de un complejo proceso biológico. Existe una calidad máxima posible que corresponde a un

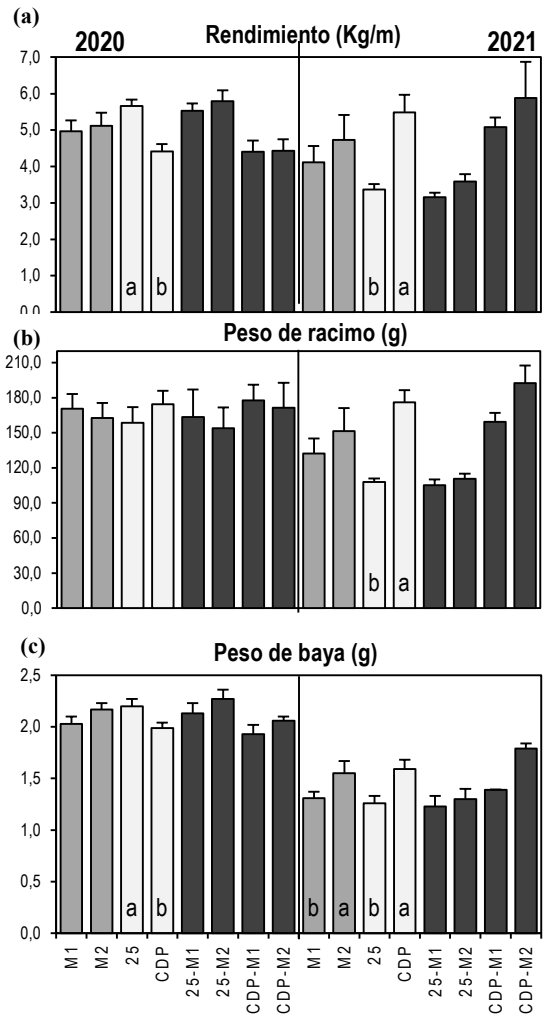


Figura 1. Componentes de rendimiento en plantas Malbec. (a) Rendimiento expresado en Kg de uva/metro lineal. (b) Peso de racimo en gramos. (c) Peso de baya en gramos.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05). Zonas de estudio: 25 (25 de mayo); CDP (Casa de Piedra). Grado de madurez: M1 (madurez 1) y M2 (madurez 2)

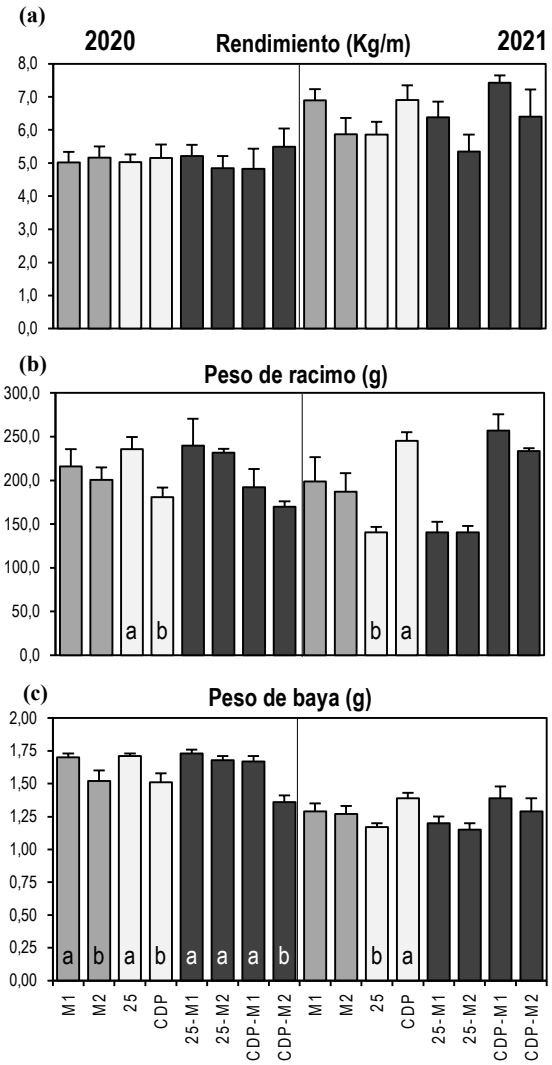


Figura 2. Componentes de rendimiento en plantas Cabernet franc. (a) Rendimiento expresado en Kg de uva/metro lineal. (b) Peso de racimo en gramos. (c) Peso de baya en gramos.
Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05). Zonas de estudio: 25 (25 de mayo); CDP (Casa de Piedra). Grado de madurez: M1 (madurez 1) y M2 (madurez 2).

rendimiento óptimo según el equilibrio vegetativo/reproductivo de las plantas y las características agroclimáticas del viñedo (Ojeda, 2007). El rendimiento de la vid se compone de varios componentes: el número de yemas por vid, brotes por yema, racimos por brote y bayas por racimo, además del peso de las bayas (Keller, 2015).

Las Figuras 1 y 2 muestran algunos de estos componentes tales como rendimiento expresado en kg/m, peso de racimos (g) y peso de bayas (g), para ambas variedades de uva (Figura 1, Malbec; Figura 2, Cabernet franc) en las dos temporadas de estudio.

Malbec

En el caso de Malbec (año 2020) tanto el rendimiento como el peso de las bayas fueron superiores en 25 de Mayo, aunque sin diferencias significativas en el peso de los racimos. Con respecto al grado de madurez, no influyó en ninguna de las variables mencionadas.

En 2021, en cambio, las plantas de Casa de Piedra presentaron mayores valores para el rendimiento, peso de racimos y de bayas. Entre ambos puntos de madurez, se observaron diferencias en el peso de bayas, siendo significativamente mayor para M2.

Si bien la carga de los viñedos se ajustó por igual en las dos localidades, las diferencias observadas en los rendimientos podrían deberse a distintos factores como las condiciones edafoclimáticas propias de cada una, la nutrición vegetal, el manejo de la canopia, entre otros (Smart *et al.*, 1990; Spayd *et al.,* 2002; Ubalde *et al.,* 2007; Keller, 2010)

Cabernet franc

Los componentes del rendimiento para esta variedad se muestran en la Figura 2. Para ambas temporadas y momentos de cosecha, no se observaron diferencias significativas en los rendimientos obtenidos (Figura 2.a).

Al analizar el peso de racimos (Figura 1.b) se presentaron diferencias significativas según la zona de estudio, en ambas temporadas (2020 y 2021), aunque no se observó impacto del grado de madurez. En este sentido, aunque las diferencias resultaron significativas en las dos temporadas analizadas, no tuvieron el mismo comportamiento, resultando en 2020 con un peso superior los racimos de las plantas ubicadas en 25 de Mayo; a diferencia del año 2021, donde resultaron con peso superior los racimos de Casa de Piedra.

Con respecto al peso de bayas (Figura 2.c), en el año 2020, no hubo diferencias en los dos momentos de cosecha en 25 de Mayo, pero si para las bayas de Casa de Piedra, siendo de menor peso en la M2. En la vendimia siguiente, se observaron diferencias significativas sólo para las zonas, obteniéndose en Casa de Piedra bayas de pesos superiores.

Parámetros analíticos generales de las uvas al momento de cosecha

En la Tabla 1 se muestran los parámetros analíticos generales de los mostos de uva Malbec y Cabernet franc luego de la molienda, para las dos temporadas.

Malbec

En la vendimia 2020, como era de esperarse, se observaron diferencias significativas en las características químicas de las uvas cosechados en distintos momentos, presentando la M2 valores significativamente mayores que la M1 con respecto al contenido de azúcares y pH, y menores en la acidez total.

En la temporada 2021 no se observaron diferencias entre M1 y M2 para los contenidos de azúcares de las uvas de 25 de Mayo, a pesar de haberse cosechado en momentos distintos. Esto indica que en dicha temporada la maduración resulto más rápida en cuanto a la acumulación de azúcares, probablemente por las condiciones climáticas, y el tiempo transcurrido entre M1 y M2 no fue suficiente para lograr una diferencia significativa en los niveles de azúcar. Diversos autores han demostrado que el proceso de maduración es un fenómeno dinámico que varía, entre otros factores, según las condiciones climáticas de cada año y zona, independientemente de la estandarización en las prácticas culturales realizadas (Gallina, 2009; Andrades y González, 1995).

Para Casa de Piedra, M2 alcanzó mayor concentración de azúcares que M1. Al analizar el pH y la acidez total, se observó igual efecto del grado de madurez que en la temporada anterior.

Con respecto a las zonas, sólo se observó efecto de este factor para la temporada 2020, siendo mayor el contenido de azúcares y menor la acidez titulable en las uvas de Casa de Piedra, lo que podría indicar una maduración más avanzada en esta zona. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de pH entre las zonas.

Cabernet franc

Durante el año 2020, no se observaron diferencias significativas entre las zonas en los valores de contenido de azúcares y pH, pero si en la acidez titulable siendo mayor para las uvas de 25 de Mayo. En la temporada siguiente (2021), se observaron diferencias significativas en los tres parámetros mencionados, para las dos zonas de estudio. Específicamente, las uvas de 25 de Mayo mostraron niveles superiores de sólidos solubles, menor pH y menor acidez que las uvas de Casa de Piedra.

Además, se observó un efecto del momento de cosecha en los tres parámetros; en las dos temporadas. Las uvas de M2 presentaron mayor contenido de azúcares, mayor pH y menor acidez.

Tabla 1 – Parámetros generales en bayas (mosto) al momento de cosecha

	2020			2021		
	Sólidos solubles (ºBrix)	**pH**	**Acidez Titulable (g ác. Tart./L)**	**Sólidos solubles (ºBrix)**	**pH**	**Acidez Titulable (g ác. Tart./L)**
MALBEC						
Madurez 1 (M1)	22,0 ± 0,28 $^{\beta}$	3,34 ± 0,02 $^{\beta}$	8,43 ± 0,45 $^{\alpha}$	24,6 ± 0,19 $^{\beta}$	3,50 ± 0,02 $^{\beta}$	5,62 ± 0,07 $^{\alpha}$
Madurez 2 (M2)	25,8 ± 0,36 $^{\alpha}$	3,67 ± 0,02 $^{\alpha}$	6,57 ± 0,26 $^{\beta}$	25,4 ± 0,16 $^{\alpha}$	3,69 ± 0,03 $^{\alpha}$	4,81 ± 0,10 $^{\beta}$
25 de Mayo (25)	23,3 ± 0,84 ^{B}	3,48 ± 0,08	8,15 ± 0,60 ^{A}	25,0 ± 0,06	3,56 ± 0,04	5,28 ± 0,15
Casa de Piedra (CDP)	24,5 ± 0,88 ^{A}	3,53 ± 0,07	6,84 ± 0,30 ^{B}	25,0 ± 0,36	3,63 ± 0,06	5,14 ± 0,24
25-M1	21,5 ± 0,27	3,31 ± 0,01	9,38 ± 0,31	24,9 ± 0,07 ^{b}	3,49 ± 0,02	5,60 ± 0,12
25-M2	25,1 ± 0,47	3,64 ± 0,04	6,93 ± 0,44	25,1 ± 0,07 ^{ab}	3,64 ± 0,02	4,97 ± 0,07
CDP-M1	22,5 ± 0,29	3,37 ± 0,03	7,48 ± 0,13	24,2 ± 0,20 ^{c}	3,51 ± 0,05	5,63 ± 0,12
CDP-M2	26,4 ± 0,12	3,69 ± 0,03	6,20 ± 0,11	25,7 ± 0,18 ^{a}	3,74 ± 0,01	4,64 ± 0,13
CABERNET FRANC						
Madurez 1 (M1)	22,1 ± 0,49 $^{\beta}$	3,44 ± 0,02 $^{\beta}$	6,08 ± 0,23 $^{\alpha}$	24,0 ± 0,31 $^{\beta}$	3,40 ± 0,04 $^{\beta}$	5,20 ± 0,07 $^{\alpha}$
Madurez 2 (M2)	25,9 ± 0,81 $^{\alpha}$	3,70 ± 0,02 $^{\alpha}$	5,09 ± 0,31 $^{\beta}$	26,1 ± 0,44 $^{\alpha}$	3,75 ± 0,03 $^{\alpha}$	3,87 ± 0,08 $^{\beta}$
25 de Mayo (25)	23,2 ± 0,86	3,57 ± 0,06	5,23 ± 0,36 ^{B}	25,8 ± 0,53 ^{A}	3,51 ± 0,08 ^{B}	4,41 ± 0,32 ^{B}
Casa de Piedra (CDP)	24,8 ± 1,15	3,57 ± 0,07	5,94 ± 0,27 ^{A}	24,3 ± 0,45 ^{B}	3,65 ± 0,07 ^{A}	4,67 ± 0,29 ^{A}
25-M1	21,8 ± 0,81	3,44 ± 0,02	5,98 ± 0,26	24,7 ± 0,07	3,32 ± 0,01	5,10 ± 0,12
25-M2	24,7 ± 0,98	3,70 ± 0,03	4,48 ± 0,10	27,0 ± 0,23	3,69 ± 0,01	3,71 ± 0,02
CDP-M1	22,5 ± 0,67	3,43 ± 0,03	6,18 ± 0,44	23,3 ± 0,18	3,48 ± 0,01	5,30 ± 0,06
CDP-M2	27,1 ± 0,88	3,71 ± 0,04	5,70 ± 0,32	25,2 ± 0,31	3,81 ± 0,02	4,03 ± 0,09

Media ± error estándar (n=3). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).
Letras mayúscula (A,B) indican diferencias significativas entre bayas de distintas zonas.
Letras griegas (α,β) indican diferencias significativas entre bayas de distinto grado de madurez.
Letras minúsculas (a,b,c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos (interacción).

Estos resultados confirman que las uvas de ambas variedades se encontraban en diferentes grados de madurez al momento de cosecha y que las bayas maduraron correctamente, evidenciado por la acumulación de azúcares y una disminución de la acidez, producto de la degradación del ácido málico y, en menor medida, del ácido tartárico. El aumento del pH, es consecuencia de la menor concentración de ácidos, tanto por degradación como por su salificación, al aumentar la concentración de los minerales, especialmente el potasio, con el avance de la maduración (Keller, 2015).

Analizando la maduración de las dos variedades en las dos temporadas, se observan diferencias en este proceso, a pesar de que las condiciones culturales fueron las mismas. Estas diferencias son propias de la influencia de los factores ambientales de cada año y de cada zona que aceleran o retrasan los cambios en la composición química de las bayas (Gallina, 2009; Andrades y González, 1995).

Características generales de los vinos

En la Tabla 2 se observan los valores de etanol (% v/v), pH y acidez titulable (g ácido tartárico/L) para los vinos elaborados con uvas Malbec y Cabernet franc de las dos zonas y en dos momentos cosechas distintos.

Malbec

En el 2020, como era de esperar, la graduación alcohólica de los vinos de ambas localidades aumentó con la madurez. En la madurez avanzada (M2) los vinos de Casa de Piedra alcanzaron el mayor valor, de acuerdo al contenido de azúcar del mosto al comienzo de la vinificación. En cuanto al pH y acidez titulable de estos vinos, la madurez aumentó el pH y disminuyó la acidez.

Con respecto a las dos zonas, no se observaron diferencias en los valores de pH pero sí en la acidez titulable, siendo los vinos de Casa de

Tabla 2 – Parámetros analíticos generales en vinos Malbec y Cabernet franc de dos localidades de La Pampa, elaborados con bayas de dos grados de madurez.

	2020				2021			
	Etanol (% v/v)	pH	Acidez Titulable*1 (g/L)	Acidez Volátil*2 (g/L)	Etanol (% v/v)	pH	Acidez Titulable*1 (g/L)	Acidez Volátil*2 (g/L)
MALBEC								
M1	12,60 ± 0,17 $^{\beta}$	3,82 ± 0,04 $^{\beta}$	5,37 ± 0,07 $^{\alpha}$	0,34 ± 0,02 $^{\beta}$	14,73 ± 0,21 $^{\beta}$	3,76 ± 0,01	5,69 ± 0,02 $^{\beta}$	0,30 ± 0,01 $^{\alpha}$
M2	15,52 ± 0,31 $^{\alpha}$	4,13 ± 0,05 $^{\alpha}$	5,08 ± 0,05 $^{\beta}$	0,49 ± 0,01 $^{\alpha}$	15,33 ± 0,03 $^{\alpha}$	3,78 ± 0,02	6,16 ± 0,12 $^{\alpha}$	0,23 ± 0,01 $^{\beta}$
25	13,59 ± 0,58 ^{B}	4,03 ± 0,08	5,12 ± 0,06 ^{B}	0,42 ± 0,02	15,25 ± 0,04 ^{A}	3,79 ± 0,01 ^{A}	6,04 ± 0,17 ^{A}	0,27 ± 0,02
CDP	14,53 ± 0,75 ^{A}	3,92 ± 0,08	5,33 ± 0,09 ^{A}	0,41 ± 0,05	14,81 ± 0,24 ^{B}	3,74 ± 0,01 ^{B}	5,80 ± 0,06 ^{B}	0,26 ± 0,01
25-M1	12,33 ± 0,27 ^{c}	3,89 ± 0,03	5,25 ± 0,04	0,38 ± 0,02 ^{b}	15,19 ± 0,01 ^{a}	3,77 ± 0,02 ^{ab}	5,68 ± 0,03 ^{b}	0,32 ± 0,01 ^{a}
25-M2	14,84 ± 0,13 ^{b}	4,16 ± 0,10	4,99 ± 0,01	0,47 ± 0,003 ^{a}	15,31 ± 0,05 ^{a}	3,82 ± 0,01 ^{a}	6,41 ± 0,08 ^{a}	0,22 ± 0,003 ^{c}
CDP-M1	12,87 ± 0,03 ^{c}	3,76 ± 0,05	5,50 ± 0,08	0,31 ± 0,01 ^{b}	14,28 ± 0,07 ^{b}	3,74 ± 0,01 ^{b}	5,69 ± 0,03 ^{b}	0,27 ± 0,01 ^{b}
CDP-M2	16,20 ± 0,11 ^{a}	4,09 ± 0,04	5,17 ± 0,07	0,51 ± 0,02 ^{a}	15,35 ± 0,02 ^{a}	3,73 ± 0,01 ^{b}	5,91 ± 0,06 ^{b}	0,25 ± 0,01 ^{bc}
CABERNET FRANC								
M1	12,93 ± 0,22 $^{\beta}$	3,96 ± 0,03 $^{\beta}$	4,88 ± 0,05	0,41 ± 0,01 $^{\beta}$	14,25 ± 0,23 $^{\beta}$	3,72 ± 0,05	5,86 ± 0,20 $^{\beta}$	0,34 ± 0,02 $^{\alpha}$
M2	15,11 ± 0,36 $^{\alpha}$	4,11 ± 0,02 $^{\alpha}$	4,79 ± 0,07	0,45 ± 0,01 $^{\alpha}$	15,99 ± 0,21 $^{\alpha}$	3,68 ± 0,08	6,79 ± 0,43 $^{\alpha}$	0,25 ± 0,03 $^{\beta}$
25	13,88 ± 0,33	4,08 ± 0,03 ^{A}	4,81 ± 0,08	0,43 ± 0,003	15,54 ± 0,41 ^{A}	3,56 ± 0,04 $^{\beta}$	7,01 ± 0,34 ^{A}	0,34 ± 0,02 ^{A}
CDP	14,16 ± 0,73	3,98 ± 0,04 ^{B}	4,87 ± 0,03	0,43 ± 0,02	14,70 ± 0,40 ^{B}	3,84 ± 0,03 $^{\alpha}$	5,65 ± 0,10 ^{B}	0,25 ± 0,03 ^{B}
25-M1	13,33 ± 0,29 ^{bc}	4,01 ± 0,03	4,96 ± 0,09 ^{a}	0,43 ± 0,01 ^{ab}	14,66 ± 0,23	3,63 ± 0,03 ^{b}	6,27 ± 0,13 ^{b}	0,37 ± 0,02
25-M2	14,43 ± 0,42 ^{b}	4,15 ± 0,01	4,66 ± 0,06 ^{b}	0,43 ± 0,003 ^{ab}	16,42 ± 0,18	3,49 ± 0,02 ^{b}	7,75 ± 0,09 ^{a}	0,30 ± 0,02
CDP-M1	12,53 ± 0,02 ^{c}	3,90 ± 0,03	4,81 ± 0,02 ^{ab}	0,39 ± 0,02 ^{b}	13,84 ± 0,21	3,82 ± 0,05 ^{a}	5,46 ± 0,10 ^{c}	0,30 ± 0,02
CDP-M2	15,80 ± 0,07 ^{a}	4,06 ± 0,03	4,92 ± 0,01 ^{a}	0,47 ± 0,01 ^{a}	15,56 ± 0,07	3,87 ± 0,01 ^{a}	5,84 ± 0,04 ^{c}	0,20 ± 0,01

Media ± error estándar (n=3). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).
Letras mayúscula (A,B) indican diferencias significativas entre vinos de distintas zonas.
Letras griegas (α,β) indican diferencias significativas entre vinos elaborados con bayas en distinto grado de madurez.
Letras minúsculas (a,b,c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos (interacción).

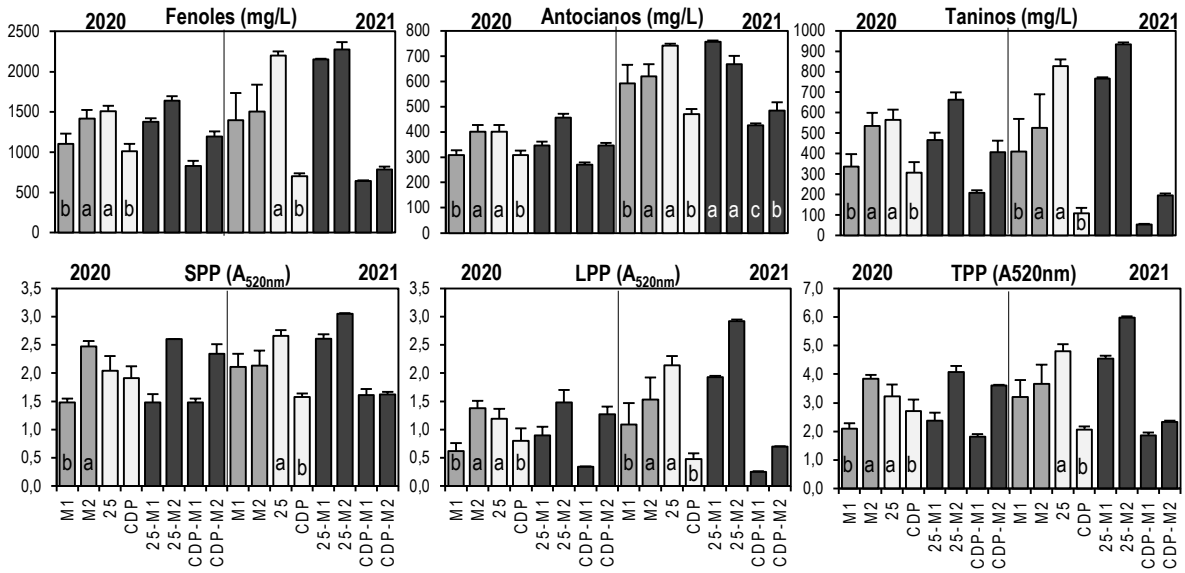


Figura 3. Parámetros fenólicos globales en vinos Malbec obtenidos en dos localidad de la provincia de La Pampa con bayas de dos grados de madurez. Letras distintas en el mismo conjunto de barras indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Piedra significativamente más ácidos. En cuanto a la acidez volátil, se observa que a mayor madurez de las uvas, los vinos poseen mayor acidez; los vinos de 25 de Mayo tuvieron mayor acidez volátil que los vinos de Casa de Piedra en M1 invirtiéndose en M2, aunque sin diferencias significativas para las dos zonas en cada momento de cosecha.

En el 2021, los vinos de Casa de Piedra aumentaron su graduación alcohólica con la madurez de las uvas y en los vinos de 25 de Mayo no hubo diferencias significativas para los dos momentos. Esto coincide con los parámetros generales de las uvas. En los vinos de 25 de Mayo, no hubo diferencias en el pH con respecto al grado de madurez de las uvas, pero sí en los valores de acidez titulable, siendo mayor en M2, y en la acidez volátil, siendo menor en ese momento. En cambio, en los vinos de Casa de Piedra no se observaron diferencias en estos tres parámetros para los distintos grados de madurez.

Cabernet franc

En el 2020, la graduación alcohólica de los vinos de 25 de Mayo no se diferenció con relación al grado de madurez. Por el contrario, en Casa de Piedra los vinos de M2 presentaron una graduación alcohólica significativamente mayor. En cuanto al pH, fue mayor en vinos de M2 y en los vinos de 25 Mayo. En cambio, la acidez titulable no se diferenció en los vinos de las dos zonas para el primer momento, siendo mayor en Casa de Piedra para el segundo momento. La acidez volátil mostró diferencias significativas sólo en los vinos de Casa de Piedra aumentando con la madurez de las uvas.

En 2021, la graduación alcohólica de los vinos fue significativamente mayor en M2 y en los vinos de 25 de Mayo, de acuerdo a al contenido de azúcares de las uvas al momento de cosecha. La acidez volátil fue mayor en los vinos de M1 y en los de 25 de Mayo. Al analizar el pH, no se diferenciaron los valores con respecto al grado de madurez, pero sí en las zonas, mostrando los vinos de Casa de Piedra mayores niveles de este parámetro. En cambio, la acidez titulable fue significativamente mayor para M2 en los vinos de 25 de Mayo pero sin diferencias significativas en los vinos de Casa de Piedra para ambas cosechas.

Si bien generalmente el pH está inversamente relacionado con la concentración de ácidos, no existe una relación simple entre la acidez titulable y el pH (Keller, 2015). Se ha observado, para ambas variedades, que una mayor acidez no implica necesariamente un pH menor y esto puede deberse a que los ácidos orgánicos pueden tener un efecto buffer, amortiguando el pH.

Si bien existe diversos trabajos que muestran que la acidez titulable en vinos disminuye con la maduración de las uvas (Cassasa *et al*, 2013; Sánchez *et al*, 2015), en otros trabajos (Fanzone *et al.*, 2020; Gallina, 2009) se ha encontrado mayores valores de acidez titulable en vinos con uvas más maduras. Esto se debe a que en la acidez titulable se cuantifica no sólo los ácidos presentes en la uva, sino también otros ácidos orgánicos que se producen como metabolitos secundarios de la fermentación alcohólica.

Composición fenólica de los vinos

Malbec

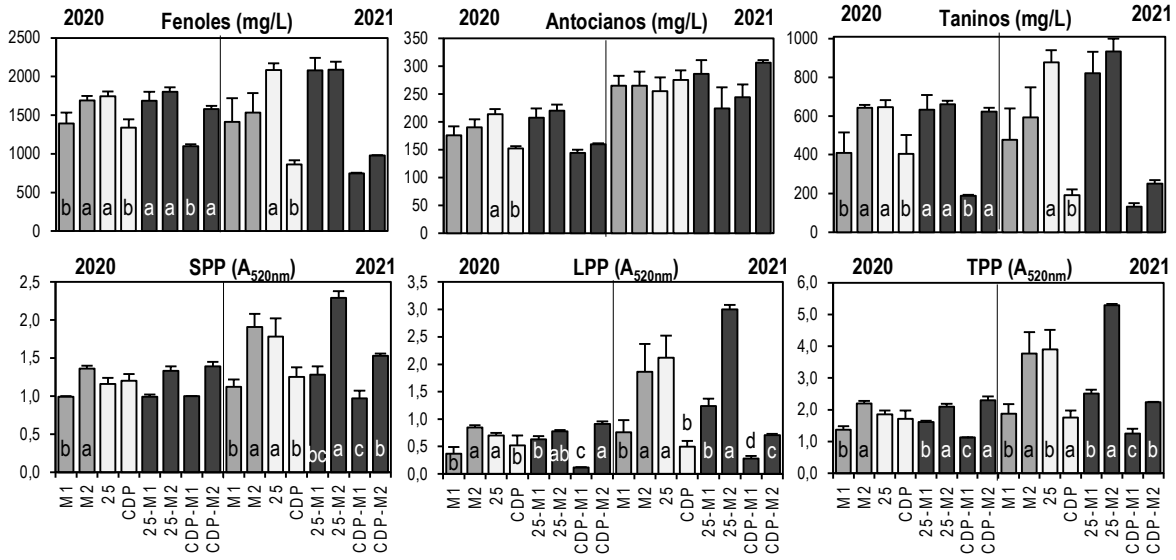


Figura 4. Parámetros fenólicos globales en vinos Cabernet franc obtenidos en dos localidad de la provincia de La Pampa con bayas de dos grados de madurez. Letras distintas en el mismo conjunto de barras indican diferencias significativas (Tukey, $p<0,05$).

En la Figura 3 se observan los parámetros fenólicos globales para los vinos de ambos momentos de cosecha y zonas de estudio (años 2020 y 2021).

En los vinos del año 2020, se observó que las muestras de 25 de Mayo contienen mayores concentraciones de fenoles, antocianinas y taninos totales que los vinos de Casa de Piedra. Con respecto a la madurez de las bayas, uvas más maduras produjeron vinos con mayores contenidos de fenoles en general, esto concuerda con numerosos trabajos que han demostrado que la madurez influye significativamente en la composición fenólica de los vinos tintos (Gallina, 2009; Gil *et al.*, 2012; Sánchez *et al*, 2015; Fanzone *et al*, 2020; Gutiérrez-Escobar, 2021).

Los pigmentos poliméricos totales (TPP) se obtienen de la suma de los pigmentos poliméricos de cadena corta (SPP) y los de cadena larga (LPP). Estos compuestos contribuyen a la estabilidad de color durante la crianza de los vinos. El contenido de TPP mostró igual comportamiento que los fenoles para ambos factores (zona y madurez), al igual que la fracción de LPP. En cambio, los SPP solo se vieron influenciados por el grado de madurez de las uvas utilizadas, siendo mayores para la M2.

En los vinos del 2021, se observó igual comportamiento a los de la temporada anterior con respecto a las zonas, siendo los vinos de 25 de Mayo los de mayores contenidos fenólicos en general. Una madurez más avanzada en las uvas produjo diferencias significativas en los contenidos de taninos totales, como así también en los LPP, sin diferenciarse los contenidos de fenoles totales y de TPP y de SPP. En el caso del contenido de antocianos para esta misma temporada, se observó una significativa mayor cantidad en los vinos de 25 de Mayo, sin diferenciarse según el grado de madurez de las uvas. Para los vinos de Casa de Piedra, se observó un aumento en el valor de este parámetro con la madurez de las uvas.

Cabernet franc

En la Figura 4 se muestran los parámetros fenólicos globales para los vinos de la variedad Cabernet franc elaborados con uvas provenientes de las dos localidades en dos diferentes momentos de madurez, para la temporada 2020 y 2021.

En los vinos del año 2020, la concentración de fenoles y taninos totales se vio afectada por la madurez, en el caso de los provenientes de 25 de Mayo. En cambio, en los vinos de Casa de Piedra estos parámetros aumentaron significativamente con la madurez de las uvas. Con respecto al contenido de antocianos, se observó diferencias significativas entre los vinos de las dos zonas, siendo mayor para los de 25 Mayo.

En cuanto al contenido de TPP y LPP, aumentaron con la madurez de las uvas, teniendo los vinos de 25 de Mayo en la M1 mayores valores a los de Casa de Piedra, para luego igualarse en la M2. El contenido de los SPP sólo fue diferente en relación al grado de madurez de las uvas utilizadas, siendo mayor para la madurez más avanzada.

En los vinos del año 2021, la concentración de taninos y fenoles totales se diferenciaron según la zona, obteniéndose valores significativamente

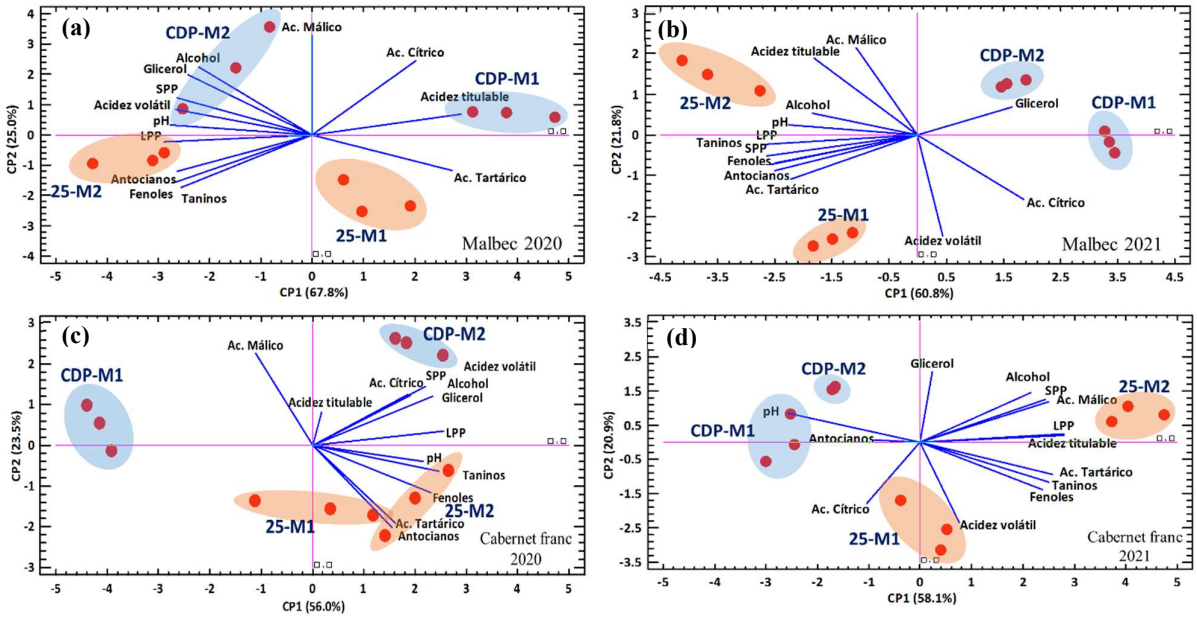


Figura 5. Análisis de Componentes Principales (ACP) en vinos Malbec y Cabernet franc elaborados con uvas de dos grados de madurez provenientes de dos localidad de La Pampa, Argentina.

superiores en los vinos de 25 de Mayo. Por el contrario, no hubo diferencias significativas para la concentración de antocianos.

Los pigmentos poliméricos en general (TPP, LPP y SPP) se diferenciaron significativamente, aumentando con la madurez para ambas zonas, siendo mayor en los vinos de 25 de Mayo para la M2.

Comparación de los vinos según los parámetros descriptos

En la Figura 5 (pág. 9) se observan los Análisis de Componentes principales para cada variedad en las dos temporadas.

Malbec

Para los vinos del año 2020, se puede observar que el 92,8% de la variabilidad se puede explicar con estos componentes. Como indica la Figura 5a, los cuatro tratamientos se diferencian entre sí. Los vinos de M1 se encuentran el cuadrante positivo del componente 1, caracterizado por la acidez titulable y los de M2 en el lado opuesto, con mayores valores de pH, pigmentos de cadena larga y alcohol, entre otros. Los vinos de 25 de Mayo, por su parte, se agrupan en la parte inferior, caracterizados por mayores contenidos de polifenoles en general.

Con respecto a los vinos del año 2021 (Figura 5b), se explica el 82,9% de la variabilidad con los primeros dos componentes. Los cuatro tratamientos están diferenciados entre sí, aunque, en este caso, se diferencian mayormente por la zona.

Los vinos de Casa de Piedra poseen mayores contenidos de glicerol, menor alcohol y pH. Por el contrario, los vinos de 25 de Mayo se destacan por mayores concentraciones de polifenoles en general.

Cabernet franc

Con el Análisis de Componentes Principales para el año 2020 (Figura 5c) se puede explicar el 79,5% de la variabilidad de los vinos. Los vinos de las dos zonas se encuentran bien diferenciados, teniendo los de 25 de Mayo mayor concentración de taninos y fenoles, y mayor pH, sin presentar grandes diferencias con respecto al grado de madurez de las uvas. Sin embargo, cundo analizamos los vinos provenientes de Casa de Piedra, se observa una marcada diferencia, siendo los de M2 más alcohólicos y con mayor contenido de SPP.

En el año 2021 (Figura 5d), la variabilidad de los datos está explicada en un 79% por los primeros dos componentes del análisis. Nuevamente se observa una marcada diferenciación entre los vinos de distintas zonas, separándose del resto los vinos los elaborados con uvas provenientes de 25 de Mayo para la M2, los cuales se destacan por tener mayores contenidos de pigmentos poliméricos en general, mayor acidez pero también mayor contenido de etanol.

4. Conclusiones

Los vinos producidos en las localidades de estudio poseen buenas características generales y

contenido de polifenoles comparables a otras zonas de vitivinícolas. Se destacan los vinos producidos en 25 Mayo por tener significativamente mayores contenidos de polifenoles en general, demostrando un mayor potencial enológico.

Con respecto al momento de cosecha, una madurez más avanzada aumenta el contenido de polifenoles en detrimento del pH, con contenidos de etanol más elevados. En este sentido, la madurez óptima no puede describirse simplemente por la acumulación máxima de componentes de la uva, sino que es una combinación compleja de las características físicas y químicas de las uvas, el estilo de vino requerido y las preferencias del mercado.

Teniendo en cuenta la importancia del pH en la estabilidad de los vinos y los resultados obtenidos en el presente trabajo, es importante analizar técnicas enológicas que permitan la reducción de este parámetro en los vinos de la región evaluada. Así mismo, se observa en ambas zonas una acumulación rápida de azucares en las bayas que se encuentra desfasada con la madurez fenólica. Por lo tanto, resulta interesante analizar técnicas que permitan mejorar la extracción de los compuestos polifenólicos de los hollejos de las uvas, lo que permitiría realizar cosechas tempranas para producir vinos con menor graduación alcohólica, sin detrimentos de la complejidad aromática y del color, de acuerdo a la normativa vigente y a la tendencia del mercado.

5. Referencias

Villareal, P.; Romagnoli, S.; Llorente, A. (2007). *Pautas tecnológicas: vid para vinificar. Manejo y Análisis económico-financiero.* 1ª ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires, Argentina. 104 p.
ISBN-13:978-987-521-229-9

INV (2021). *Informe Anual de superficie 2020*. Subgerencia de Estadística y Asuntos Técnicos Internacionales. Mendoza, Argentina. Disponible en:
https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos/estadisticas

Aumassanne, C. (2019) *Impacto de los cambios en el uso y la cobertura de la tierra y de la variación del clima, sobre los componentes principales del balance de agua en la cuenca del río Colorado, Argentina.* Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina. 176 p.
DOI: 10.35537/10915/82130

Ribéreau–Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2003). *Tratado de enología.* Vol 2. Química del vino, estabilización y tratamientos. 1º ed, Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp. 177–258.
ISBN 950-504-573-5

Gawel, R. (1998) *Red Wine Astringency: a review.* Australian Journal of Grape and Wine Research, 4(2), pp 74-95.
DOI: 10.1111/j.1755-0238.1998.tb00137.x

Sáenz-Navajas, M.; Campo, E.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. (2010) *An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine.* Food Chemistry 121: pp 1139–1149.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.01.061

Monagas, M; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. (2005) *Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45 (2), pp 85-118.
DOI: 10.1080/10408690490911710

Downey, M.O.; Dokoozlian, N.K.; Krstic, M.P. (2006). *Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine.* American Journal of Enology and Viticulture, 57 (3), pp 257-268.
https://www.ajevonline.org/node/5320.full

Düring, H.; Davtyan, A. (2002). *Developmental changes of primary processes of photosynthesis in sun- and shade-adapted berries of two grapevine cultivars.* Vitis, 41 (2), pp 63-67.
DOI: 10.5073/vitis.2002.41.63-67

Ubalde, J. M.; Sort, X.; Poch, R. M.; Porta, M. (2007) *Influence of edapho-climatic factors on grape quality in Conca de Barberà vineyards (Catalonia, Spain).* J. Int. Sci. Vigne Vin, 41 (1), pp 33-41.
DOI: 10.20870/oeno-one.2007.41.1.859

Gutiérrez-Escobar, R.; Aliaño-González, M.J.; Cantos-Villar, E. (2021) *Wine polyphenol content and its influence on wine quality and properties: A review.* Molecules, 26, pp 718-779.
DOI: 10.3390/molecules26030718

Fanzone, M. L. (2012) *Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (vitis vinifera l.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial*. Tesis de doctorado. Universitat Roviri i Virgili, Tarragona, España. 368 p.
http://hdl.handle.net/10803/81715

OIV (2017) *Compendium of international methods of wine and must analysis* (vols. 1-2). París, Francia: Organización Internacional de la Viña y el Vino.

Harbertson, J. F., Picciotto, E. A., y Adams, D. O. (2003). *Measurement of polymeric pigments in*

grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. Am. J. Enol. Vitic, 54(4), pp 301-306.
ISSN 0002-9254

Gordillo, B. y otros 7 autores (2015). *Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin–flavonol–flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions.* J. Agric. Food Chem, 63, pp 7645-7653.
DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00181

The Jamovi Project (2021). Jamovi. (Version 2.0) [Software Informático]. Sídney, Australia. https://www.jamovi.org

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2020) Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. http://www.infostat.com.ar

Ojeda, H. (2007) *¿Cómo se relaciona la calidad de la uva y del vino con el rendimiento del viñedo?* Revista Enología, 5, Año IV.

Keller, M. (2015). *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology.* 2da ed. Elsevier Inc, San Diego, Estados Unidos. 508 p.
ISBN: 978-0-12-419987-3

Smart, R. E.; Dick, J. K.; Gravett, I. M. (1990) *Canopy Management to Improve Grape Yield and Wine Quality – Principles and Practices.* S. Afr. J. Enol. Vitic., 11 (1).
DOI: 10.21548/11-1-2232

Spayd, S.E.; Tarara, J.M.; Mee, D.L.; Ferguson, J.C. (2002) *Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of Vitis vinifera cv. Merlot Berries.* Am. J. Enol. Vitic. 53:3, pp 171-182

Keller, M. (2010) *Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists.* Australian Journal of Grape and Wine Research, 16, pp 56–69
DOI: 10.1111/j.1755-0238.2009.00077.x

Cassasa, L. F. y otros 6 autores (2013) *Influence of Fruit Maturity, Maceration Length, and Ethanol Amount on Chemical and Sensory Properties of Merlot Wines*. Am. J. Enol. Vitic., 64 (4), pp 437-449.
DOI: 10.5344/ajev.2013.13059

Sánchez, N.; Aleixandre–Tudó, J. L.; Aleixandre, J. L. (2015) *Evolución fenólica y calidad sensorial de los vinos tintos de bobal elaborados utilizando diferentes tecnologías.* Enoviticultura, 37, pp 17-29.
http://hdl.handle.net/10251/92944

Gallina, M. (2009) *Influencia del estado de madurez y la exposición de los racimos de la cv. Pinot noir (Vitis vinifera L.) en la composición de la uva y el vino, en el Alto Valle de río Negro y Neuquén.* Tesis de maestría. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. 97 p.

Andrades Rodríguez, M. S.; González San José, M. L. (1995) *Influencia climática en la maduración de la uva: Estudio de cultivares de La Rioja y Madrid.* Zubía, 7, pp 79-102.
ISSN 0213-4306

Fanzone, M. y otros 9 autores (2020). *Combination of pre-fermentative and fermentative strategies to produce Malbec wines of lower alcohol and pH, with high chemical and sensory quality.* OENO One, 54, 4, pp 1041-1058.
DOI: 10.20870/oeno-one.2020.54.4.4018

Gil, M. y otros 6 autores (2012). *Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color, Polyphenolic Composition, and Polysaccharide Content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines.* J. Agric. Food Chem. 2012, 60, pp 7988−8001.
DOI: 10.1021/jf302064n

18TCA - Vinificaciones orgánicas espontáneas del Sur Mendocino: parámetros enológicos y microbiológicos.

Spontaneous organic winemaking south of Mendoza: enological and microbiological parameters.

Bruno Thomas Álvarez[1], Elisa Sepúlveda[1], Sergio Adrián Sini[1], Raúl Chernikoff[1], Néstor Alonso[1,2], Marcela Johana Villalón Olivares[2], Cecilia Adriana Flores[1], María Silvina Cabeza[1,3,*]

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (UNCuyo). Bernardo de Irigoyen 375.
2. Solandes S.A.
3. CONICET.
   E-mail: mscabeza@fcai.uncu.edu.ar.

Resumen

El vino orgánico está en auge impulsado porque la población reconoce que distintas prácticas agrícolas influyen en el medio ambiente; y la pandemia actual que generó en los consumidores preocupación por mejorar su salud, eligiendo alimentos saludables sin sustancias nocivas para la salud. Es extensamente conocida la influencia de la microbiota – variable según numerosos factores: ubicación geográfica del viñedo, condiciones climáticas, prácticas vitícolas, variedad e integridad de la uva, entre otros – sobre las características organolépticas finales del vino. En uvas orgánicas, se ha demostrado una baja biodiversidad como consecuencia de tratamientos antifúngicos permitidos (cobre y azufre). Se presenta el estudio de los parámetros enológicos – según metodología INV – y microbiológicos – recuento en cámara y células viables en placa – de vinos orgánicos del sur de Mendoza (Malbec y Cabernet Sauvignon) elaborados mediante fermentación espontánea. Se analizó la evolución de la vinificación espontánea por pérdida de peso y temperatura de fermentación. La fermentación presentó demora en el inicio, la velocidad máxima de fermentación se alcanzó el día 4-5, con mayor velocidad fermentativa en Malbec. Se completó la fermentación entre 14 y 17 días, restando menos de 4 g/L de azúcares reductores. Los parámetros enológicos se mantuvieron por debajo de los límites permitidos por el INV. No se pudieron recuperar levaduras ya que no resistieron el tiempo de congelación de las muestras hasta su evaluación, aunque si sobrevivieron bacterias (mayormente bacilos y algunos cocos). Se concluye que vinos elaborados espontáneamente a partir de uvas orgánicas en buena condición fitosanitaria logran completar la fermentación, alcanzando grado alcohólico elevado y sin alteraciones organolépticas en los mismos.

Palabras clave: vinos orgánicos, vinificación espontánea, microbiota vínica

Abstract

Organic wine is booming, driven because the population recognizes that different agricultural practices influence the environment; and the current pandemic that generated in consumers concern about improving their health, choosing healthy foods without substances harmful to health. The influence of the microbiota – variable according to numerous factors: geographical location of the vineyard, climatic conditions, viticultural practices, variety and integrity of the grape, among others – on the final organoleptic characteristics of the wine is widely known. In organic grapes, low biodiversity has been shown as a consequence of permitted antifungal treatments (copper and sulfur). The study of the oenological parameters – according to INV methodology – and microbiological – cell count and viable cells on plate – of organic wines from southern Mendoza (Malbec and Cabernet Sauvignon) made by spontaneous fermentation are presented. The evolution of spontaneous vinification was analyzed by weight loss and fermentation temperature. The fermentation was delayed at the beginning, the maximum fermentation speed was reached on day 4-5, with the highest fermentation speed in Malbec. Fermentation was completed between 14 and 17 days, with less than 4 g / L of reducing sugars remaining. The oenological parameters were kept below the limits allowed by the INV. Yeasts could not be recovered since they did not withstand the freezing time of the samples until their evaluation, although bacteria survived (mostly bacilli and some cocci). It is concluded that wines made spontaneously from organic grapes in good phytosanitary condition manage to complete the fermentation, reaching a high alcoholic degree and without organoleptic alterations in them.

Keywords: organic wine, spontaneous winemaking, wine microbiome

1. Introducción

La producción y venta de vino orgánico en todo el mundo ha mostrado una tendencia positiva considerable. Es el producto de tendencia en la industria de bebidas, específicamente en los países bebedores de vino, incluidos Francia, Italia, Australia y Argentina. El pronóstico del mercado global de vino orgánico indica una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) del 10,6% para un período 2021-2027. La epidemia de COVID-19 tuvo un efecto bastante positivo en el mercado del vino orgánico. La propagación de COVID-19 impulsó la conciencia sobre un estilo de vida saludable que incluye ejercicio físico, una dieta saludable y el cuidado personal entre las personas. Además, la demanda de alimentos y bebidas nutritivos aumentó entre los consumidores para fortalecer su inmunidad. Se cree que los productos químicos artificiales utilizados en alimentos y bebidas tienen efectos negativos sobre la salud. Por lo tanto, los consumidores evitaron los alimentos con productos químicos sintéticos. Muchos consumidores recurrieron a alimentos y bebidas orgánicos debido a la percepción de sus ventajas sobre los productos tradicionales. Además, muchos gobiernos de todo el mundo ofrecieron estímulos monetarios para el sector agrícola durante la pandemia. Esto, a su vez, alentó a los agricultores a cultivar uvas orgánicas, impulsando el mercado del vino orgánico. Por otra parte, varios restaurants y cafés ofrecen ahora productos orgánicos, aumentando la demanda (Infinium Global Research, 2021).

El área de cultivo de uva orgánica en el mundo aumentó de 87.655 ha en 2004 a 403.047 ha en 2017 (Willer y Lernoud, 2019). Al mismo tiempo, el consumo mundial de vino orgánico aumentó en un 48,3% durante el período de 2012 a 2017 (IWSR, 2018). Los países con el mayor consumo mundial de vino orgánico son Alemania (con una participación del 23,9%), Francia (16,4%) y el Reino Unido (10,2%). Italia ocupa una posición inferior en este ranking con una participación del 2,4%.

Durante 2020, hubo un incremento del 24% de las exportaciones de vinos orgánicos argentinos (SENASA, 2021).

El término vino orgánico no significa lo mismo que elaborado con uvas orgánicas. Para comercializar un vino orgánico hace falta certificar además del cultivo de la uva, el proceso de vinificación. Hay límites en el uso y contenido de anhídrido sulfuroso y en muchos casos se exige utilizar levaduras autóctonas en vinificación. El uso de productos enológicos está también regulado (Pino Torres, 2013).

La calidad del vino se ve influenciada por las levaduras, que además de transformar el azúcar en alcohol etílico durante la fermentación son las responsables de otorgar al vino características tales como cuerpo, viscosidad, color, flavor y el perfil aromático, entre otros. Se ha estudiado ampliamente que la variedad y proporción de diferentes levaduras en las bayas de uva y en los mostos depende de muchos factores como son ubicación geográfica del viñedo, condiciones climáticas, variedad de uva, tecnología de vinificación e integridad de la uva (Tofalo et al., 2011).

Diferentes estudios han demostrado la baja biodiversidad de levaduras y organismos tipo levadura presentes en los viñedos orgánicos es consecuencia de los tratamientos antifúngicos permitidos a base de cobre y azufre (Grangeteau et al., 2017). Sin embargo, los microorganismos nativos están mejor adaptados a las condiciones químico-ambientales de la uva/mosto del área de proveniencia, por lo que son capaces de dar características distintivas a los vinos (Cappozi et al., 2015). Por otra parte, la microflora nativa también puede jugar un rol de detrimento por acumulación de compuestos indeseables o formación de velo en la interfase líquido-aire. Las técnicas de vinificación también influyen en la aparición de levaduras de deterioro, especialmente en los vinos orgánicos, donde algunas legislaciones establecen usos estrictamente regulados de aditivos y adyuvantes (Perpetuini et al., 2020).

A pesar del dominio de cepas de S. cerevisiae durante la vinificación, en las fermentaciones espontáneas se desarrollan típicamente levaduras no-Saccharomyces durante la vinificación, lo que implica una diversidad de levaduras más alta, un incremento del aroma, determinándose perfiles de flavor diferentes a los vinos convencionales por la síntesis de metabolitos de interés. Sin embargo, un crecimiento excesivo, incontrolado o por parte de determinadas cepas de estas especies no-*Saccharomyces*, puede suponer claramente una alteración del vino y la producción de aromas desagradables como excesiva producción de acidez volátil (Guillamón, 2016).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad enológica y la biodiversidad de microorganismos de vinos orgánicos elaborados por fermentación espontánea.

2. Materiales y métodos

2.1 Uvas y fermentación espontánea

Las uvas tintas empleadas en este estudio fueron cosechadas en 2019 de viñedos orgánicos certificados desde 2010 por la Organización Internacional Agropecuaria (OIA), pertenecientes a la empresa Solandes S.A., ubicados en Villa Atuel, San Rafael, al sur de la provincia vitivinícola de Mendoza, Argentina. Estos viñedos cumplen los estándares de la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM). Las variedades elegidas fueron: Malbec y Cabernet Sauvignon.

Se molió la uva en la bodega, se adicionó nutriente complejo (100% componentes naturales derivados de levadura) y metabisulfito de potasio (12 mg/L). Se prosiguió con la fermentación espontánea, en tanques de 20 L, en la Bodega Solandes S.A., dedicada a producir vinos orgánicos (certificada bajo Norma Orgánica Argentina / Unión Europea + IFOAM (NOA), National Organic Program (NOP), Japanese Agricultural Standard (JAS) y Canada Organic), según sus protocolos de vinificación. Se realizaron 3 ensayos en paralelo para cada variedad.

Se estudió la evolución de la fermentación por pérdida de peso diaria, controlándose a su vez, la temperatura.

En vino terminado, se estudiaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: densidad, alcohol, extracto seco, azúcares reductores, acidez total y volátil y SO_2 total, según metodología oficial del INV. Todas las mediciones fueron tomadas por triplicado.

Para el ensayo microbiológico, se tomaron muestras todos los días durante la fermentación, y se congelaron para ser analizadas en conjunto posteriormente. Se utilizó el método de extensión en placa en agar YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 2% agar) para el recuento de células viables en placa y cámara de Neubauer y azul de metileno para distinguir las levaduras muertas con microscopio (aumento: 400 x) para el recuento directo de levaduras vivas.

Los datos se analizaron estadísticamente para determinar si existen diferencias significativas entre las variedades (ANOVA).

3. Resultados y Discusión

La Fig. 1 muestra los tanques en donde se realizaron las fermentaciones espontáneas, cuya evolución fue medida por diferencia de peso provocado por la pérdida de CO_2, producto de la fermentación alcohólica.

Figura 1. Tanques de fermentación espontánea de uvas orgánicas, variedad Cabernet Sauvignon

Como se puede observar en la Fig. 2, las fermentaciones espontáneas se extendieron 14 y 17 días, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente. La velocidad máxima de fermentación se observó al día 4 en el caso de Malbec y 5 en Cabernet Sauvignon, siendo un 50% mayor para Malbec. Sin embargo, la velocidad de fermentación en Cabernet Sauvignon fue más sostenida.

Al ser una fermentación espontánea, no se inocularon levaduras, y por ello es notable el comienzo retrasado de la fermentación (Fig, 2), presentando una mayor fase de latencia de las levaduras fermentativas, donde no se evidenció prácticamente diferencia de peso por pérdida de CO_2.

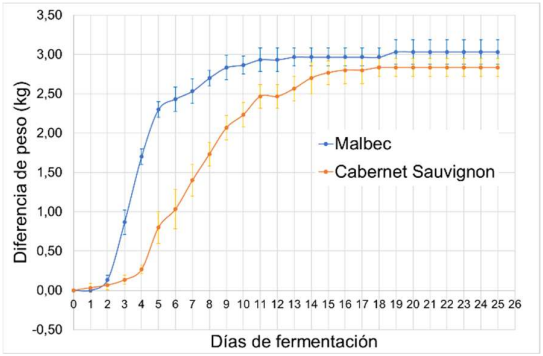


Figura 2. Evolución de la fermentación espontánea de uvas orgánicas

Las temperaturas de fermentación variaron entre 17 y 18°C de mínima, y 24°C y 23,5°C de máxima, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente.

De acuerdo a los parámetros fisicoquímicos obtenidos (Tabla 1), ambas variedades pudieron completar la vinificación, obteniendo vinos secos (con azúcares reductores residuales inferiores a 4

g/L), partiendo de 24,8 y 25°Bx, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente. Se alcanzó un grado alcohólico proporcional a los azúcares iniciales, lo que indica que no se produjeron desviaciones durante la fermentación alcohólica.

El extracto seco determinado en ambos varietales es alto, con valores similares a los encontrados en vinos elaborados con producción orgánica de los Valles Calchaquíes de Salta, Argentina (Pérez et al., 2015).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de vinos orgánicos.

Parámetro	Malbec	Cabernet Sauvignon
Densidad (g/L, 20°C)	0,9943 ± 0,0002 [a]	0,9957 ± 0,0003 [b]
Alcohol (% vol, 20°C)	14,7 ± 0,1 [a]	14,8 ± 0,2 [a]
Extracto seco (g/L)	33,8 ± 0,2 [a]	37,5 ± 0,1 [b]
Azúcares reductores (g/L)	3,05 ± 0,09 [a]	1,7 ± 0,05 [b]
Acidez total, en ácido tartárico (g/L)	4,5 ± 0,16 [a]	5,3 ± 0,1 [b]
Acidez volátil, en ácido acético (g/L)	0,65 ± 0,03 [a]	0,79 ± 0,03 [b]
SO_2 total (mg/L)	30 ± 0,5 [a]	30 ± 0,3 [a]

[a, b] – letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos en las filas ($p < 0,05$).

El ácido acético tiene un impacto negativo en la performance fermentativa, es inductor fisiológico de la apoptosis de *S. cerevisiae* y afecta la calidad de ciertos tipos de vino cuando se encuentra presente en un nivel dado. Este ácido puede tener diversos orígenes en el vino. Puede provenir del mosto: bacterias acéticas (*Gluconobacter* y *Acetobacter*) especialmente en uvas afectadas con hongos; bacterias ácido lácticas, particularmente en uvas maltratadas pueden crecer rápidamente Lactobacilos; y levaduras contaminantes como *Hansenula*, en uvas sin sulfitar o mosto no inoculado. Durante la fermentación alcohólica: algunas bacterias acéticas pueden sobrevivir y causar daño; algunos *Oenococcus* pueden producirlo incluso con pequeña cantidad de azúcares residuales; *S. cerevisiae* produce 0,1-0,3 g/L en uvas sanas con concentración moderada de azúcar (<220 g/L), algunas cepas producen más de 1 g/L, y se conoce que desvía su metabolismo hacia mayor generación ante condiciones de estrés; levaduras de deterioro como *Pichia anomala, Candida krusei, Candida stellata, Hanseniaspora uvarum/Kloeckera apiculata, Saccharomycodes ludwiggii* producen altos niveles de acético antes y durante el inicio de la fermentación. En la fermentación maloláctica también se puede incrementar la acidez volátil. Ya en la etapa de vino, se puede generar un aumento sustancial de ácido acético por bacterias acéticas (*A. pasterianus*), bacterias lácticas (*Lactobacillus, Pediococcus y Leuconostoc*) y *Dekkera/Brettanomyces* (Vilela-Moura et al., 2011). En este estudio, la acidez volátil se mantuvo en valores inferiores a lo permitido por el INV (0,80 g/l en ácido acético, vinos tintos para la libre circulación). Podría relacionarse la mayor concentración presente en Cabernet Sauvignon con la demora en el inicio de la fermentación, dando lugar a la posible acción de microorganismos de deterioro hasta la aparición de las levaduras fermentativas y el correspondiente ambiente alcohólico.

El SO_2 total fue ajustado a 30 mg/L finales, según protocolo de vinificación de la empresa para sus vinos orgánicos.

Para determinar la microbiota presente en el mosto/vino orgánico y realizar el recuento de células viables se analizaron las muestras diarias congeladas. Lamentablemente, por la epidemia de COVID-19, las muestras permanecieron congeladas por un largo período (18 meses), lo que provocó que las levaduras que estaban presentes en los mostos-vinos murieran, visualizadas en color azul en la cámara de recuento (Fig. 3). En total concordancia con lo observado microscópicamente, no se obtuvo crecimiento de levaduras en las placas de recuento de células viables. Sin embargo, como puede observarse en la Fig. 4, algunas bacterias permanecieron viables, gracias a la baja dosificación de SO_2.

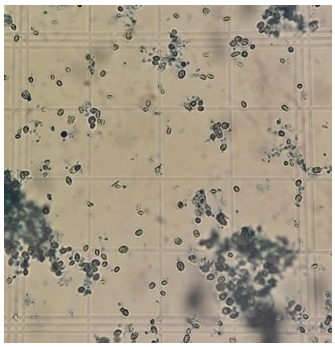
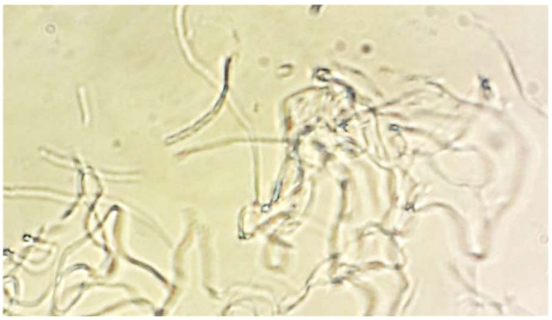
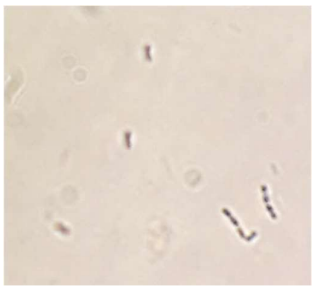


Figura 3. Recuento en cámara de Neubauer, muestra teñida con azul de metileno

Figura 4. Recuento de células viables: Día 5 de fermentación, Malbec Orgánico, Dilución 10^{-1}, YEPD.

Por microscopía, se pudo determinar la presencia de bacilos (Fig. 5) móviles y no móviles, algunos en cadena y en otros casos aislados, de diferente tamaño (largo y ancho). También se encontraron muy pocos cocos o coco-bacilos en cadena o en tétradas.





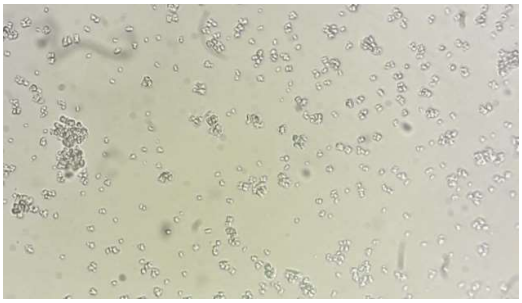


Figura 5. Observación microscópica de microorganismos vínicos: a) y b) Bacilos en cadena; c) cocos en cadena; d) cocos en pares, tétradas y agrupaciones

4. Conclusiones

Los vinos elaborados espontáneamente a partir de uvas orgánicas en buena condición fitosanitaria lograron completar la fermentación, alcanzando un grado alcohólico elevado y no detectándose alteraciones organolépticas en los mismos. Todos los parámetros enológicos se encontraron por debajo de los límites establecidos por el INV.

La duración de la fermentación fue más prolongada en comparación con una fermentación inoculada (datos no mostrados), ya que la fase de latencia se extendió y la velocidad de fermentación no es tan elevada.

No se pudieron rescatar las levaduras nativas a partir de las muestras congeladas, posiblemente debido al tiempo que transcurrió entre la toma de las mismas hasta el análisis microbiológico.

Se propone retomar el estudio en una nueva cosecha, a fin de seleccionar levaduras de interés para su estudio enológico y posibilitar una futura inoculación de vinos orgánicos con microorganismos autóctonos adaptados a las condiciones propias de estas uvas.

5. Referencias

Cappozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. (2015). *Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine*, Microbiol Res. 181, 75-83.

Guillamón, J. M. (2016). *Diversidad microbiana y alteraciones durante la fermentación alcohólica: el yin y el yang para el enólogo*, ACE: Revista de enología 154.

Idioma: español

Grangeteau, C.; David, V.; Hervé, A.; Guilloux-Benatier, M.; Rousseaux, S. (2017). *The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could explain lower yeast biodiversity in organic vineyards,* FEMS Yeast Research 17 (8).

Infinium Global Research (2021). *Organic Wine Market: Global Industry Analysis, Trends, Market Size, and Forecasts up to 2027.* https://www.infiniumglobalresearch.com/food-beverage/global-organic-wine-market. Acceso: 8/12/2021.

IWSR (2018). *The global organic wine market 2012-22.* https://www.vinavisen.dk/vinavisen/website.nsf/pages/IWSR.pdf/$file/IWSR.pdf. Acceso: 8/12/2021.

Pérez, N.; Di Carlo, B.; Salomón, R.; Moyano, F.; Peñaranda, S.S.; Zerpa, G. (2015). *Caracterización físico-química de vinos tintos regionales*, XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bs. As., Argentina.

Perpetuini, G.; Tittarelli, F.; Battistelli, N.; Suzzi, G.; Tofalo, R. (2020). *Contribution of Pichia manshurica strains to aroma profile of organic wines,* Eur Food Res Technol 246, 1405-1417.

Pino Torres, C.A. (2013). *Manual de Vitivinicultura Orgánica*. Trama Impresores S.A., Curicó, Región Del Maule, Chile.

SENASA (2021). *Situación de la Producción Orgánica en la Argentina durante el año 2020*. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/1_situacion_de_la_po_en_la_argentina_ano_2020_0.pdf Acceso: 09/12/2021.

Tofalo, R.; Schirone, M.; Telera, G.C.; Manetta, A.C.; Corsetti, A.; Suzzi, G. (2011). *Influence of organic viticulture on non-Saccharomyces wine yeast populations*., Ann Microbiol. 61, 57-66.

Vilela-Moura, A.; Schuller, D.; Mendes-Faia, A.; Silva, R. D.; Chaves, S. R.; Sousa, M. J.; Côrte-Real, M. (2011). *The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines,* Appl Microbiol Biotechnol 89, 271-280.

Willer, H.; Lernoud, J. (eds) (2019). *The world of organic agriculture. Statics and emerging trends 2019.* Research Institute of Organic Agriculture FiBL, Frick and IFOAM-Organics International, Bonn.

19TCA - Caracterización de bagazos provenientes de diferentes estilos de cerveza artesanal y recuperación alcalina de proteínas.

Characterization and recovery of brewers' spent grains proteins from different styles of beer

Luciana M. Rodriguez[1,2]*, Julia L. Camina[2], Diana T. Constenla[1,2], María V. Borroni[3], Ethel E. Pérez[1,2]

1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur (UNS), Av. Alem 1253. Primer Piso - Ala C, 8000 Bahía Blanca, Argentina.
2. Planta Piloto de Ingeniería Química - PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga km 7, 8000 Bahía Blanca, Argentina.
3. Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología - (ITPN-UBA-CONICET).
E-mail:lurodriguez@plapiqui.edu.ar

Resumen

El bagazo (grano agotado de cebada malteada), constituye el principal residuo proveniente de la industria cervecera y es rico en compuestos bioactivos tales como proteínas, fibras y aceite. Actualmente, es utilizado principalmente para la alimentación animal o se desecha directamente, constituyendo un enorme desperdicio de recursos y causando una grave contaminación ambiental. Al presente, el interés por utilizar la proteína vegetal como alternativa a la proteína animal ha aumentado en los últimos años. Por lo tanto, la recuperación de proteínas a partir del grano agotado puede representar de gran valor para la industria alimentaria, no solo por el agregado de valor, sino también reduciendo costos en el tratamiento de residuos. El objetivo del presente trabajo, fue la caracterización de bagazos obtenidos de la elaboración de distintos estilos de cerveza artesanal (Dorada y Scottish) y posterior extracción alcalina de las proteínas obtenidas. Se caracterizaron los bagazos utilizados en contenido de aceite, proteína, contenido de azúcares, FDN y FDA. La extracción alcalina de proteínas alcanzó rendimientos entre 59-72% dependiendo el tipo de bagazo utilizado y por último se caracterizaron las proteínas obtenidas en cuanto a su composición.

Palabras claves: proteínas, bagazo, prolaminas, grano agotado.

Abstract

Bagasse (brewers' spent grains) constitutes the main residue from the brewing industry and is rich in bioactive compounds such as proteins, fibers and oil. Currently, it is used mainly for animal feed or is disposed of directly, constituting a huge waste of resources and causing serious environmental pollution. The interest in using vegetable protein as an alternative to animal protein has increased in recent years. Therefore, the recovery of proteins from depleted grain can represent a great value for the industry, not only by adding value, but also by reducing costs in waste treatment. The aim of the present work was the characterization of bagasse obtained from the elaboration of different styles of craft beer (Dorada and Scottish) and alkaline extraction of their proteins. The bagasses used were characterized in terms of oil, protein, sugar content, NDF and FDA content. The alkaline extraction of proteins reached yields between 59-72% depending on the type of bagasse used and finally the proteins obtained were characterized in terms of their composition.

Keywords: proteins, bagasse, prolamins, spent grain.

1. Introducción

La cerveza es una bebida fermentada conocida desde la antigüedad y consumida en grandes cantidades en muchos países del mundo (Mussato *et al.* 2014; Rachwall *et al.* 2020). Como resultado del proceso de elaboración de cerveza, la industria cervecera genera anualmente una gran cantidad de residuos. Los tres principales desechos incluyen el grano gastado de la cebada (bagazo o BSG), el lúpulo agotado y la levadura de cerveza residual (Rachwall *et al*. 2020). El bagazo constituye el 85% del total de residuos generados, siendo el principal. (Salihu y Bala, 2011). Este está constituido por parte del pericarpio y las capas de la cubierta de la semilla de cebada (Mussato *et al.* 2006). En algunos casos, según el tipo de cerveza a producir, se pueden utilizar otros cereales como maíz, arroz, trigo, avena, centeno o sorgo mezclados con la malta de la cebada, los cuales se denominan adjuntos. En tales casos, la parte insoluble de estos granos, después del proceso de maceración, puede derivarse únicamente de la malta de cebada o de una mezcla de malta de cebada con sus adjuntos, debido a ello la composición del bagazo puede variar ampliamente, de acuerdo al tipo de cerveza que se elabore (Mussato *et al.* 2014). Por lo tanto, esta variación puede ser atribuida al tipo de grano y su tiempo de cosecha, a los adjuntos utilizados, como también así al proceso de malteado (Salihu y Bala, 2011; Robertson et al., 2010).

El bagazo es básicamente un material lignocelulósico, cuyos componentes principales son fibra (hemicelulosa y celulosa), proteína y lignina. La fibra constituye aproximadamente la mitad de su composición en peso seco, mientras que las proteínas pueden constituir hasta un 30% del peso seco. Este alto contenido de fibra y proteínas hace que BSG sea una materia prima interesante para aplicaciones tanto alimentarias como no alimentarias (Lynch *et al.* 2016). A pesar de estar fácilmente disponible, su uso tradicional es como alimento para animales (Xiros *et al.* 2008). Avances recientes en la ciencia aseguran que el BSG podría ser utilizado en la industria de alimentos debido a su contenido nutricional, el mismo resulta de gran interés para la aplicación y fortificación de productos alimenticios para humanos, particularmente en vista de su bajo costo y disponibilidad en grandes cantidades. Además, se está comenzando a reconocer la importancia del BSG como ingrediente y fuente potencial de componentes bioactivos que promueven la salud. Las investigaciones de usos alternativos de BSG es pertinente, no solo desde la perspectiva de la industria cervecera que puede beneficiarse de la valorización de este subproducto, sino también desde una perspectiva medioambiental como el reciclaje y la reutilización de desechos y subproductos industriales se ha vuelto cada vez más importante (Bonifácio-Lopes *et al.* 2019) En este contexto, una de las principales áreas para explorar este tipo de residuos es la recuperación de componentes valiosos para la obtención de productos de valor agregado. Por lo tanto, la recuperación de proteínas a partir de residuos de elaboración de cerveza puede representar una fuente innovadora y de gran valor para la industria, no solo por el agregado de valor, sino también para su incorporación en alimentos como alternativa a la proteína animal.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de distintos bagazos provenientes de la elaboración de diferentes estilos de cerveza artesanal y la recuperación de proteínas para dar valor agregado.

2. Materiales y métodos

a. Materias primas

Los bagazos utilizados fueron obtenidos de diferentes procesos de elaboración de cervezas realizado por la cátedra de Laboratorio de Procesamiento de Alimentos, del Departamento de Ingeniería Química (UNS). Los tipos de cervezas empleados fueron Dorada y Scottish. Del estilo Scottish se utilizó una muestra y del estilo Dorada se seleccionaron dos residuos provenientes de distinta producción. La cerveza Dorada fue elaborada con dos tipos de maltas, Pilsen y Viena, en una relación en peso de 15:1, respectivamente. Mientras que la elaboración de Scottish fue llevada a cabo con tres tipos de maltas, Pilsen, Caramelo 60 y Chocolate, en una proporción en peso de 4:1:0,03. Por otra parte, ambos estilos de cerveza también se diferencian en su graduación alcohólica, por lo que es importante el contenido de azúcares fermentables presentes en las maltas.

b. Caracterización de las materias primas

La caracterización de los bagazos se realizó luego de acondicionar las muestras, para ellos los BSG fueron secados en estufa de aire forzado a 45°C, ya que los mismos presentaban un elevado contenido de humedad (~65%). Luego, se determinó el contenido de humedad final, lípidos, proteínas, fibras estructurales y contenido de azúcares totales. Los bagazos también fueron caracterizados por color.

El contenido de humedad fue determinado según técnica IUPAC 1.121, por secado en estufa de vacío a 100 ºC hasta peso constante (Paqueot, 1992). La determinación del contenido de aceite

se llevó a cabo en un equipo Soxhlet, empleando *n*-hexano grado comercial como solvente, siguiendo la norma IUPAC 1.122 (Paqueot, 1992). El contenido de proteína cruda se determinó utilizando el método de Kjeldahl (Helrick, 1990). Para el análisis de las fibras estructurales, se siguió el método de Van Soest *et al.* 1991. El contenido de humedad y lípidos, proteínas y fibras estructurales fue expresado en base seca (% b.s.).

La composición de azúcares se determinó por cromatografía liquida (HPLC) según el método basado en las normas AOAC 925.05 (1990), con las modificaciones propuestas por Liu y Markakis (1987). Aproximadamente 0,5 g de cada muestra fue sometidas a extracción de los azúcares solubles utilizando 50 mL de etanol 80% mediante agitación durante 1 h a 80 ºC. El líquido se concentró en un evaporador rotatorio hasta reducir el volumen a un 50% (eliminación del etanol) y se transfirió a un tubo de centrífuga, en donde se procedió a la precipitación de las proteínas por agregado de acetato de plomo neutro (solución saturada, aproximadamente 2 mL), se centrifugó y luego se dejaron reposar durante 15 minutos. El sobrenadante se diluyó con agua destilada, se mezcló y se filtró a través de un papel de filtro. Finalmente, se llevó a volumen en un matraz de 25 mL (Extracto).
El contenido de azúcares fue determinado siguiendo el método utilizado por Martínez Ruiz (2005), con algunas modificaciones. Se utilizó un sistema cromatográfico Alliance e2695 (Waters, EEUU), equipado con una columna Rezex ROA Organic Acid (Phenomenex, EEUU) de 300 mm x 7,8 mm, bucle de inyección de 10 µL y detector de índice de refracción modelo 2414 (Waters, EEUU). Como fase móvil se empleó una solución 5 10-3N de H2SO4, con un flujo de 0,6 mL/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 65ºC. El programa de procesamiento de datos utilizado fue Empower 2 (Shimadzu, Japón). Los carbohidratos utilizados como patrones fueron: maltosa, glucosa y fructosa (Anedra, EEUU).
La cuantificación se realizó por comparación de áreas por el método del estándar externo, utilizando como referencia soluciones de los diferentes azúcares en concentraciones de 0.1 a 10 mg/mL.
Se tomaron porciones de 4 mL de los extractos de azúcares y filtradas con un filtro MILLIPORE de 0,45 µm hasta recolectar 2 mL de solución. La muestra se mantuvo a -20 ºC hasta realizar el análisis por HPLC.
Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de azúcares referidos a la masa inicial libre de humedad. Por otra parte, se determinó el perfil de azúcares que fue expresado como rendimiento relativo (% de cada azúcar respecto del total de azúcares presente en el bagazo).

La determinación de color se realizó mediante un colorímetro espectrofotométrico HunterLab UltraScan XE (Hunter Associates Laboratory, Inc. Reston, VA). A tal fin, una fracción bagazo fue colocada en una cápsula de plástico cerrada herméticamente. Se midió el color reflejado de todas las muestras. Los resultados fueron expresados en términos de la escala CIELab: L* luminosidad [0 = negro, 100 = blanco], a*[verde (-), rojo (+)] y b* [azul (-), amarillo (+)]. Las muestras se midieron por triplicado.

Por otra parte, la determinación de la composición proteica, se realizó por extractabilidad secuencial mediante el fraccionamiento Osborne modificado y las fracciones fueron separadas en glutelinas, prolaminas, globulinas y albúminas. El proceso secuencial para el fraccionamiento de las proteínas del bagazo se llevó a cabo, en primer lugar, utilizado 2 g de muestra y 10 mL de agua, la dispersión se mantuvo con agitación constante, luego se centrifugó para aislar la fracción sólida del sobrenadante (sob) que contenía la primera fracción de proteínas (albúminas). El residuo sólido obtenido fue colocado en diferentes soluciones de manera secuencial, en primera instancia se colocó en NaCl 1% nuevamente con agitación constante y posterior centrifugación para obtener la segunda fracción de proteínas, correspondiente a las globulinas. El tercer paso fue la extracción de las prolaminas, en este caso, antes del agregado de los solventes se realizó un lavado con agua del residuo sólido y luego de la centrifugación (1562 xg) se procedió a incorporar los solventes (15 mL de solución con 50% isopropanol, 2% mercaptoetanol y 1% ácido acético glacial), se mantuvo la mezcla con agitación constante a temperatura y se procedió a centrifugar nuevamente (Fido, 2004). La última secuencia del fraccionamiento correspondió a la fracción de glutelinas con NaOH 0,1 M, previo lavado con agua nuevamente y realizando el mismo procedimiento (agitación constante y posterior centrifugación). La cuantificación de cada fracción proteica se llevó a cabo por el método colorimétrico de Lowry (Lowry, 1951). Las fracciones proteicas fueron expresadas como rendimiento relativo (% de cada fracción proteica respecto del total de proteína presente en el bagazo).

c. Recuperación de proteínas

La recuperación de proteínas de los bagazos (BSG) se realizó mediante extracción alcalina empleando una modificación de método utilizado por Celus *et. al.* 2007. El concentrado de proteína de los bagazos se preparó con NaOH 0,1 M a

40ºC, utilizando una relación sólido:líquido de 1,7:10. Luego de 60 min de extracción, las muestras fueron centrifugadas a 3000 xg por 20 min, a temperatura ambiente, para separar el residuo sólido del líquido (sobrenadante). Posteriormente se acidificó el sobrenadante con ácido cítrico 2,0 M, hasta el punto isoeléctrico de las proteínas de dorada y Scottish (3,5 y 4,0, respectivamente) para lograr su precipitación. Para la recuperación de las proteínas se centrifugó en centrífuga refrigerada a 7°C, a 5000 rpm, por 10 minutos y se recuperó el precipitado. El residuo solido obtenido de la primera centrifugación fue sometido nuevamente a tratamiento alcalino y se repitió el procedimiento, obteniéndose así, dos extracciones de cada residuo (1° y 2° extracción). Finalmente, los precipitados fueron liofilizados para su posterior uso.

Los concentrados proteicos obtenidos de cada residuo, fueron caracterizados según su rendimiento, su composición proteica, a partir del fraccionamiento de Osborne de la misma manera que para los bagazos y según la composición de azúcares. El rendimiento proteico fue definido como el porcentaje de proteína recuperada por cada 100 g de bagazo seco.

d. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) usando el software Infostat (Di Rienzo, 2017). La comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

3. Resultados y Discusión

a. Caracterización de las materias primas

Los bagazos utilizados como materias primas para la recuperación de proteínas fueron caracterizados según su contenido de humedad final, proteína y lípidos (Tabla 1).

Tabla 1: Contenido de humedad, lípidos y proteínas de los bagazos.

Bagazo	Humedad (%b.s.)	Aceite (%b.s.)	Proteína (%b.s.)
Scottish	7,81 ± 0,09	3,01 ± 0,14^a	17,73 ± 0,17^a
Dorada 1	10,8 ± 0,10	1,94 ± 0,05^b	15,92 ± 0,15^b
Dorada 2	11,60 ± 0,07	2,05 ± 0,03^b	14,94 ± 0,14^c

Los datos son valores medios ± error estándar n=3. Los valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes (p>0,05) por método Tukey.

La Tabla 1 muestra el contenido de humedad final de los diferentes bagazos luego del secado. Todos los residuos presentaron un contenido de humedad menor a 12 % b.s. para garantizar su estabilidad y la calidad microbiológica para su posterior uso (Rodriguez *et al.* 2020).

El análisis estadístico presentó diferencias significativas ($p<0,05$) en el contenido de aceite entre los bagazos correspondientes al estilo Dorada y el estilo Scottish. Algunos autores han reportado contenido aceite de muestras de bagazo, con valores superiores a los obtenidos en este trabajo, por ejemplo, del Rio *et al.* 2013 y Yu *et al.* 2020, reportaron valores de 9,2 y 9,4%, respectivamente.

En cuanto al contenido de proteínas, si bien todos los residuos analizados presentaron diferencias significativas entre ellos ($p<0,05$), los residuos provenientes de estilo Dorada, exhibieron el menor contenido proteico. Aun así, todos los valores se encuentran dentro del rango reportado por otros autores (Patel *et al.* 2018; Yu *et al.* 2020; Alonso-Riaño *et al.* 2021). Algunas investigaciones han reportado que el contenido de proteínas varía significativamente de acuerdo al origen del bagazo (12-30%) (Patel *et al.* 2018; Yu *et al.* 2020; Alonso-Riaño *et al.* 2021).

Los residuos analizados presentaron un contenido de FDN entre 40 y 47 %, siendo los valores obtenidos 40,81 %, 40,42 % y 47,07 % para Dorada 1, Dorada 2 y Scottish, respectivamente. Por otro parte, el contenido de FDA fue de 14,47 %, 15,82 % y 17,37 % para Dorada 1, Dorada 2 y Scottish, respectivamente. Según los datos obtenidos, el BSG del estilo Scottish presentó el mayor contenido de aceite, proteínas y fibras estructurales comparado con los bagazos del estilo Dorada.

El contenido total de azúcares de los bagazos fue de 98,95 ± 3,36; 92,76 ± 3,17 mg/ g BSG seco para de Dorada 1 y 2 respectivamente y el menor contenido fue presentado por Scottish con un valor de 48,25 ± 0,70 mg/ g BSG.

Los azúcares presentes en las muestras de bagazo fueron maltosa, glucosa y fructosa, siendo el primero el de mayor proporción para las tres muestras. La Figura 1 muestra el contenido de los azúcares presentes en cada muestra analizada.

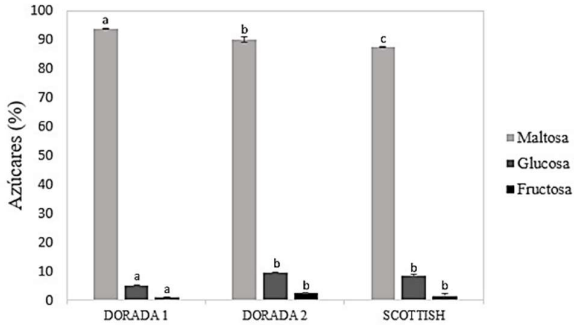


Figura 1: Contenido de maltosa, glucosa y fructosa de los BSG analizados.

En el análisis de varianza se comparó el contenido de cada tipo de azúcar para las tres muestras. El contenido de maltosa en cada bagazo presentó diferencias significativas entre las muestras ($p<0,0001$). Mientras que, para el contenido de glucosa y fructosa, el residuo de Dorada 1 fue el que presentó diferencias significativas respecto a los residuos de Doradas ($p=0,0012$), con los menores valores obtenidos de ambos azúcares.

La Figura 2 muestra un cromatograma del perfil de azúcares para el bagazo obtenido de Scottish.

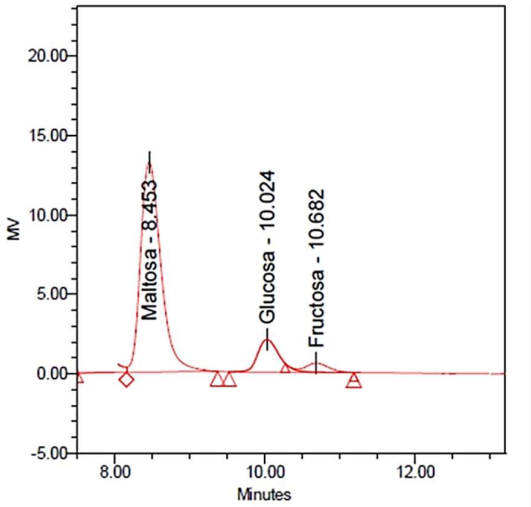


Figura 2: Perfil de azúcares de bagazo proveniente de Scottish.

La determinación de color se llevó a cabo midiendo los parámetros L, a y b. La tabla 2 muestra los valores obtenidos para cada bagazo.

Tabla 2: Determinación de color mediante los parámetros L, a y b, de los bagazos analizados

Bagazo	L	a*	b*
Scottish	59,56 ± 0,39[a]	2,48 ± 0,05[a]	22,42 ± 0,09[a]
Dorada 1	63,99 ± 0,57[b]	1,78 ± 0,12[a]	22,48 ± 0,07[a]
Dorada 2	52,08 ± 0,27[c]	2,64 ± 0,09[b]	19,12 ± 0,11[b]

Los datos son valores medios ± error estándar n=3. Los valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($p>0,05$) por método Tukey.

Mediante el análisis de color se observó diferencias significativas con un $p<0,0001$ en el parámetro L, para todos los bagazos analizados, mientras que para los parámetros a y b, el bagazo obtenido de la dorada 2 presentó diferencias respecto de los otros dos a un $p<0,001$.

El fraccionamiento de proteínas según solubilidad (Osborne) fue realizado sobre los tres residuos analizados y permitió la caracterización del tipo de proteínas presentes en los diferentes tipos de bagazo. Según Negi R. y Naik K. (2017) las proteínas del bagazo se pueden clasificar en no prolaminas (albúminas y globulinas), prolaminas y glutelinas. A partir del procedimiento secuencial llevado a cabo sobre los residuos se determinó la presencia de albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Las prolaminas de BSG son proteínas de almacenamiento insolubles, mientras que las albúminas y globulinas constituyen la fracción soluble que tiene importancia funcional y nutricional (Negi R. y Naik K., 2017).
Como se muestra en la Tabla 3, las prolaminas fueron las proteínas mayoritarias, con un porcentaje relativo que superó el 77%, seguidas por las glutelinas (~15%). Mientras que las globulinas son las que se encuentran en menor proporción con valores inferiores al 2,3% en todos los casos. Ikram *et al.* 2017 reportaron que las proteínas mayoritarias en el bagazo cervecero son las prolaminas y las glutelinas, con valores de 43% y 21,5%, respectivamente. Mientras que las globulinas y albúminas representan, en conjunto, solo un 7,5% del total de proteínas presentes en el bagazo; estos valores se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 3: Fraccionamiento de Osborne de los bagazos analizados.

Fracciones	Scottish	Dorada 1	Dorada 2
Albúminas	4,79 ± 1,02[a]	5,55 ± 2,50[a]	4,83 ± 0,11[a]
Globulinas	2,31 ± 0,20[a]	2,03 ± 0,64[a]	1,79 ± 0,20[a]
Prolaminas	77,52 ± 1,43[a]	77,01 ± 8,05[a]	85,15 ± 0,09[a]
Glutelinas	15,38 ± 0,20[a]	15,40 ± 5,00[a]	8,22 ± 0,01[a]

Los datos son valores medios ± error estándar n=2. Los valores en la misma fila con la misma letra no son significativamente diferentes ($p>0,05$) por método Tukey.

b. Recuperación de las proteínas

Luego de llevar a cabo la caracterización de las muestras se realizó la recuperación de proteína por método alcalino. La Figura 3 muestra el rendimiento total obtenido para cada uno de los bagazos analizados, y cada columna está subdividida en primera y segunda extracción.

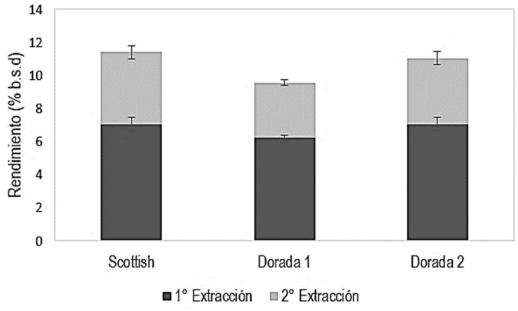


Figura 3: Rendimiento de proteínas a partir de la extracción alcalina para cada bagazo

Los rendimientos obtenidos para cada uno de los bagazos, no presentaron diferencias significativas en el rendimiento total en un análisis general ($p>0,05$). Sin embargo, realizando una comparación frente al contenido de proteína extraído referido al total de proteína presente en cada muestra, se observó que con el bagazo de Dorada 2 se recuperó el mayor contenido de proteínas, reportando un 72,39 % de proteína extraída respecto del total de proteína presente en la muestra, mientras que para Scottish se recuperó un 62,49 % y la menor recuperación se logró con el residuo de Dorada 1 donde solo se recuperó el 59,03 % del total de proteína presente en la muestra. Esto podría deberse a la variabilidad de la composición inicial de las muestras, donde el contenido de fibra podría inferir en la liberación de la proteína durante la extracción, como así también la composición de las mismas.

Por otra parte, al comparar la primera y segunda extracción se observa que las tres muestras comparadas presentan un comportamiento similar durante la extracción, logrando recuperar en la primera, alrededor entre un 62-65 % y en la segunda, alrededor del 36-38 %, no presentando diferencias significativas ($p>0,05$) entre muestras para cada extracción, pero si entre primera y segunda extracción para cada muestra ($p<0,05$).
Los valores obtenidos en este análisis se encuentran en concordancia con los reportados por otros autores. Connolly *et al.* 2013, obtuvieron rendimientos del 59 % y de 15 % para BSG de dos estilos diferentes, Pale y Black, respectivamente; dichos autores realizaron dos extracciones con álcali, de una hora cada una, a temperatura ambiente, con una relación S:L, 1:20. Ellos reportaron que durante el proceso de maceración de la cervecería, las prolaminas y glutelinas tienden a agregarse en un complejo impenetrable estabilizado por enlaces disulfuro intra e intermolecular. Estos agregados, forman parte de la capa superior del BSG y contribuyen al complemento proteico del grano gastado residual. Por lo tanto, puede ser necesario el uso de procedimientos de pretratamiento o de alteración vigorosa para ayudar a la recuperación de proteínas de BSG (Connolly *et al.*, 2013).
Por su parte, Celus *et al.* 2007, reportaron una extracción del 60 % de proteínas para BSG realizando una sola extracción, durante 1 hora, a 60 °C (temperatura superior a la utilizada en este trabajo), valor similar a lo reportado en el presente trabajo en una primera extracción.
Si bien los rendimientos obtenidos son elevados, no debería descartarse la posibilidad de realizar una tercera extracción para mejorar el rendimiento.

Los concentrados proteicos obtenidos de los tres bagazos analizados también fueron caracterizados mediante el contenido de azúcares totales, con valores de 11,37 ± 0,73; 24,99 ± 0,99; 13,65 ± 0,43 mg/g de concentrado proteico para Dorada 1, Dorada 2 y Scottish, respectivamente.
Los azúcares presentes en los concentrados proteicos fueron maltosa, glucosa y fructosa, siendo el primero el de mayor proporción para las tres muestras. La Figura 4 muestra el contenido de los azúcares presentes en cada muestra analizada.

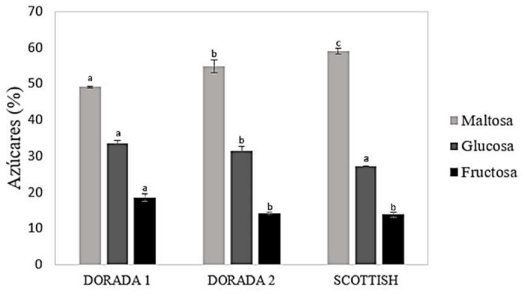


Figura 4: Contenido de maltosa, glucosa y fructosa de los concentrados obtenidos de los tres bagazos.

En el análisis de varianza se comparó el contenido de cada tipo de azúcar para los tres concentrados. El contenido de maltosa en cada bagazo presentó diferencias significativas entre las muestras ($p<0,0001$), siendo mayor para el concentrado proteico de Scottish. Por otra parte, la Dorada 1 presentó diferencias significativas en Fructosa, respecto de los otros dos concentrados y la Dorada 2 ($p=0,0006$), presentó diferencias significativas en el contenido de Glucosa con respecto al concentrado de Scottish y Dorada 1 ($p=0,0004$). Si bien se observaron diferencias significativas en la composición de azúcares de los concentrados, no se observó una tendencia o similitudes entre los concentrados.
La Figura 5 muestra un cromatograma del perfil de azúcares para el concentrado proteico de bagazo obtenido de Scottish.

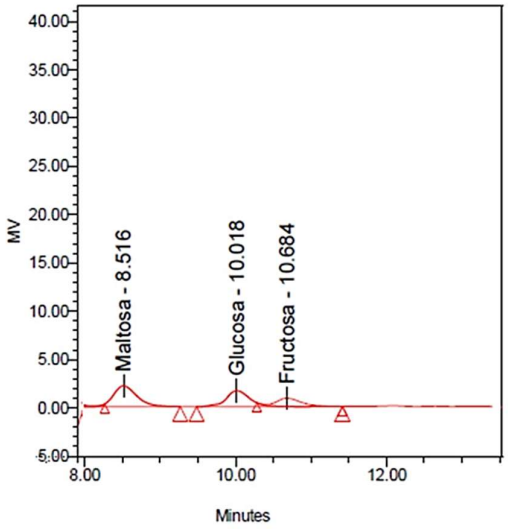


Figura 5: Perfil de azúcares de concentrado proteico proveniente de Scottish.

Por último, se llevó a cabo el fraccionamiento de Osborne sobre los tres concentrados proteicos obtenidos. Esta metodología permitió determinar el perfil de proteínas presentes en los diferentes concentrados. En la tabla 4 se observa que todos los concentrados proteicos presentaron una composición proteica similar a la de las materias primas correspondientes, donde se distingue que en los tres concentrados las proteínas mayoritarias son las prolaminas, mientras que las de menor proporción son las globulinas y albúminas como ha sido reportado por Ikram et al. (2017).
Al comparar cada fracción proteica entre los tres concentrados analizados, no se observaron diferencias significativas entre ellos (p>0,05) para ninguna de las fracciones.

Tabla 4: Fraccionamiento de Osborne de los concentrados proteicos analizados.

Fracciones	Scottish	Dorada 1	Dorada 2
Albúminas	3,95 ± 0,74^{a}	3,80 ± 0,06^{a}	2,06 ± 0,60^{b}
Globulinas	1,39 ± 0,32^{a}	1,29 ± 0,16^{a}	1,09 ± 0,40^{a}
Prolaminas	78,01 ± 2,91^{a}	80,09 ± 2,02^{a}	80,93 ± 5,15^{a}
Glutelinas	16,66 ± 3,33^{a}	14,82 ± 1,91^{a}	15,92 ± 4,15^{a}

Los datos son valores medios ± error estándar n=2. Los valores en la misma fila con la misma letra no son significativamente diferentes (p>0,05) por método Tukey.

4. Conclusiones

La reutilización de subproductos agroindustriales, se ha convertido en un tema de gran interés por los diversos beneficios, desde el punto de vista ambiental y económicos que además promueven el desarrollo sostenible. El bagazo es un subproducto abundante producido en cervecerías de todo el mundo y en Argentina debido al auge de las cervecerías artesanales en los últimos años. Sin embargo, a pesar de la amplia gama de posibles aplicaciones que van surgiendo, todavía se restringe su uso y en la actualidad sigue siendo utilizado principalmente como alimento para animales. En el presente trabajo se llevó a cabo la recuperación de proteínas de diferentes bagazos obtenidos durante procesos de elaboración de cervezas artesanales de diferentes estilos, realizando en primera instancia una caracterización de los mismos, donde se observó que la composición puede variar de acuerdo al tipo de residuo analizado, por lo que resulta de gran importancia el origen de este. Posteriormente, se procedió a la recuperación de proteínas mediante el método alcalino, con rendimientos entre 59 y 72% dependiendo del residuo.
Este estudio podría contribuir a la búsqueda de potenciales usos de los bagazos, para el agregado de valor a partir de la recuperación de componentes bioactivos como son las proteínas, discriminando los residuos según su composición para potenciar su uso.

5. Referencias

Alonso-Riaño, P. y otros 4 autores (2021). *Subcritical water as hydrolytic medium to recover and fractionate the protein fraction and phenolic compounds from craft brewer's spent grain.* Food Chemistry, 351, 129264.

Bonifácio-Lopes, T. y otros 2 autores (2020). *Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain–A review.* Critical reviews in food science and nutrition, 60(16), 2730-2741.

Celus, I. y otros 2 autores (2007). *Enzymatic hydrolysis of brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates.* Journal of agricultural and food chemistry, 55(21), 8703-8710.

Connolly, A. y otros 2 autores (2013). *Characterization of protein-rich isolates and antioxidative phenolic extracts from pale and black brewers' spent grain.* International Journal of Food Science & Technology, 48(8), 1670-1681.

del Rio J.C. y otros 2 autores (2013). *Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals.* Journal of Cereal Science 58. 248-254.

Di Rienzo, J. A. y otros 5 autores (2017). *InfoStat software version 2017*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Fido, R. J. y otros 3 autores (2004). *Protein extraction from plant tissues.* In Protein Purification Protocols (pp. 21-27). Humana Press.

Helrick, K. (1990) *Official Methods of Analysis.* Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Ikram, S. y otros 4 autores (2017). *Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain.* Journal of food science, 82(10), 2232-2242.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). *Protein measurement with Folin-phenol reagent.* Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.

Lynch, K. M. y otros 2 autores (2016). *Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health*. Journal of the Institute of Brewing 122 (4) 553-568.

Martínez Ruiz, J.A. (2005). *Hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado con invertasa y Aspergillus niger inmovilizados en el medio de cultivo sólido.* Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Posgrado en Biotecnología, México

Mussatto, S. I. y otros 2 autores (2006). *Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications*. Journal of cereal science, 43(1), 1-14.

Mussatto, S. I. (2014). *Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(7), 1264-1275.

Negi, R., y Naik, A. (2017). *Non-prolamin fraction from brewer's spent grain: a novel plant-based emulsifier.* Journal of Food Measurement and Characterization, 11(2), 887-893.

Osborne, T.B. (1924). *The Vegetable Proteins.* London, UK: Longmans, Green and Co.

Paqueot, C. y Hautfenne, A. (1992) Section 1: *Oleaginous seeds and fruits. In: Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives.* International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). 7a ed. London: Blackwell Scientific. 13-16.

Patel, A. y otros 3 autores (2018). *Valorization of brewers' spent grain for the production of lipids by oleaginous yeast.* Molecules, 23(12), 3052.

Rachwał, K. y otros 4 autores (2020). *Utilization of brewery wastes in food industry*. PeerJ, 8, e9427.

Robertson, J. A. y otros 6 autores (2010). *Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production*. LWT Food Sci. Technol. 43, 890-896.

Rodriguez L.M. y otros 2 autores (2020). *Evaluación composicional de bagazo de diferentes estilos de cerveza artesanal para su valorización.* ICPR-Americas 2020 Conference.

Salihu, A. y Bala, M. (2011). *Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications.* African Journal of Biotechnology 10(3) 324-331.

Van Soest, P. V. y otros 2 autores (1991). *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition.* Journal of Dairy Science, 74(10), 3583-3597.

Wang, C. y otros 5 autores (2010). *Functionality of barley proteins extracted and fractionated by alkaline and alcohol methods.* Cereal chemistry, 87(6), 597-606.

Xiros, C., y Christakopoulos, P. (2012). *Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications.* Waste and Biomass Valorization, 3(2), 213-232.

Yu, D. y otros 7 autores (2020). *Recovery of protein hydrolysates from brewer's spent grain using enzyme and ultrasonication.* International Journal of Food Science & Technology, 55(1), 357-368.

20TCA - Co-encapsulación de aceite de chía y antioxidantes naturales

Co-encapsulation of chia oil and natural antioxidants

Carolina A. Acosta[1], M. Laura Spotti[1], Massimiliano Vassallo[1], M. Julia Spotti[1], Silvana A. Fioramonti[1], Carlos R. Carrara[1]

1. Área de Estudios Fisicoquímicos de Alimentos, Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, 1º de Mayo 3250, Santa Fe, Argentina. carol.anabella@gmail.com

Resumen
Los ácidos grasos omega-3 aportan numerosos beneficios a la salud. Sin embargo, su ingesta suele ser insuficiente. El aceite de chía es una excelente fuente de omega-3, pero su elevada susceptibilidad oxidativa limita su uso. La microencapsulación por secado spray constituye una excelente alternativa para mejorarla. Como objetivo se planteó co-encapsular omega-3 y antioxidantes (vitamina E, β-caroteno, astaxantina) mediante la formulación de emulsiones multicapa, utilizando como material de pared proteínas del lactosuero, pectina de alto metoxilo (PAM) y maltodextrina/inulina, y posterior secado spray. Luego se estudió la estabilidad oxidativa de las microcápsulas frente al almacenamiento (8 semanas, 4ºC/30ºC). Se encontró que 0,3% de PAM fue la concentración que promovió la formación de una doble capa estable alrededor de la interfase aceite-agua en las emulsiones. Además, a 4°C la presencia de antioxidantes no tuvo relevancia en los parámetros de oxidación del aceite encapsulado. Sin embargo a 30°C el agregado de antioxidantes fue indispensable para mantener los indicadores de oxidación por debajo de los límites permitidos, siendo la astaxantina la mejor opción. Los resultados de este estudio sugieren que el agregado de antioxidantes tendría un rol fundamental si se desea aplicar este ingrediente funcional en un alimento no refrigerado.

Palabras clave: omega-3, antioxidantes, microcápsulas

Abstract
Omega-3 fatty acids provide several benefits to health. However, some epidemiological studies suggest omega-3 fatty acid intake is not sufficient. Chia oil is an excellent source of omega-3, but its oxidative susceptibility limits its usage. Microencapsulation by spray drying could be an alternative to improve it. The objective of this work was to co-encapsulate omega-3 and antioxidants (vitamin E, β-carotene, astaxanthin) by designing multi-layer emulsions, using whey protein isolate, high methoxyl pectin (HMP) and maltodextrin/inulin as wall materials, and then spray drying these emulsions to obtain powdered microcapsules. Oxidative stability of microcapsules during storage (8 weeks, 4ºC and 30ºC). It was found that 0,3% of HMP was the best concentration to produce a stable protein-polysaccharide double layer around oil-water interface in emulsions. On the other hand, antioxidants presence did not have a considerable effect on oxidative parameters when storing microcapsules at 4ºC. Nevertheless, at 30ºC, antioxidants addition was indispensable to keep oxidative indicators below the recommended limits, being the astaxanthin the best option. These results suggest that addition of antioxidants would play a fundamental role if this functional ingredient needs to be added to non-refrigerated food formulations.

Keywords: omega-3, antioxidants, microcapsules.

1. Introducción

Los alimentos funcionales son aquellos que proporcionan beneficios para la salud más allá de su valor nutritivo (Cámpora M.C., 2016). Uno de los campos emergentes en los últimos años consiste en la co-encapsulación de múltiples sustancias bioactivas de manera de promover un efecto sinérgico entre ellas y mejorar así sus propiedades beneficiosas para el organismo (Chawda et al., 2017). En particular, los carotenoides son una clase de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza y actualmente existe un gran interés en su función biológica, ya que han sido relacionados con la prevención de enfermedades degenerativas, como la aterosclerosis y el cáncer (Lin et al., 2016).

La astaxantina (ASX) es el principal ceto-carotenoide encontrado en muchos organismos marinos y en aves. Debido a la similitud estructural entre los carotenoides, muchos comparten las mismas vías metabólicas y funciones fisiológicas. Sin embargo, la presencia de grupos cetónicos e hidroxílicos en los anillos de la ASX, le aportan algunas propiedades particulares, entre ellas, una mayor capacidad antioxidante y mayor prevención de la producción de especies de oxígeno reactivo (Kamezaki et al., 2016). Varios estudios han demostrado que la ASX tiene una mayor capacidad antioxidante que la vitamina E (Vit E) y el β-caroteno (B-C) y que es significativamente más efectiva que el B-C y la luteína para prevenir la fotooxidación lipídica por irradiación con luz UV (Santocono et al., 2006; Nishino et al., 2005; Nishigaki et al., 1994).

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 son nutrientes esenciales que podrían adicionarse a la formulación de un alimento, ya que se les han atribuido numerosos efectos beneficiosos (Rodea-González et al, 2012; Uauy y Dangour, 2006). Según Simopoulos (2008) el desbalance omega-3/omega-6 que existe hoy en día en la dieta occidental moderna, por un exceso en el consumo de omega-6, podría estar relacionado con el incremento de enfermedades autoinmunes y a la proliferación de células cancerosas. Es por ello que también resulta importante enriquecer alimentos con omega-3 para contrarrestar este desbalance.

El aceite de chía (AC) es una de las mejores fuentes vegetales para este fin, ya que su fracción lipídica posee la proporción de omega-3 más alta conocida hasta el momento, con un porcentaje del 58-65% de α-linolénico (18:3) (Rodea-González et al., 2012). La desventaja es que posee una elevada susceptibilidad oxidativa que limita su uso, debido a la presencia de dobles enlaces conjugados, lo que promovería una disminución de su actividad biológica y limitaría su uso en la producción, transporte y almacenamiento de alimentos (Lin et al., 2016; Marineli et al, 2014). En este sentido, la microencapsulación constituiría un excelente método de estabilización de estos compuestos lábiles. Esta técnica consiste en el empaquetamiento del nutracéutico de interés en un núcleo o centro activo rodeado por una pared de un material biopolimérico que lo recubre y protege del medioambiente que lo rodea. Se pueden obtener microcápsulas de tamaño del orden de los micrones, que pueden liberar su contenido bajo condiciones específicas, conservando las propiedades biológicas o fisicoquímicas de los compuestos encapsulados (Gharsalloui et al., 2007).

Una alternativa para la microencapsulación de estos compuestos podría ser el secado por aspersión de emulsiones multicapa. Las cuales consisten en pequeñas gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, recubiertas por una película interfacial formada por polímeros de carga opuesta, acomplejados mediante interacciones electroestáticas (McClements et al, 2007; Sagalowicz y Leser, 2010; Guzey y McClements, 2006). Entre los polímeros más utilizados, se encuentran las proteínas del lactosuero (WPI, whey protein isolate, por sus siglas en inglés) y pectinas. Estos polímeros, en función del pH, adoptarán carga neta positiva o negativa, por lo tanto podrán unirse mediante interacciones electrostáticas para formar el film interfacial.

Teniendo en cuenta estas evidencias, resultaría interesante incorporar estos compuestos bioactivos a matrices alimentarias. Por lo tanto, se planteó como objetivo co-encapsular omega-3 y antioxidantes, con el fin de aumentar su estabilidad oxidativa, utilizando la tecnología de emulsiones multicapa, y obtener un ingrediente funcional en polvo. Para ello, es necesario: (i) diseñar emulsiones doble capa para encapsular aceite de chía y estudiar la influencia de la concentración de pectina sobre la formación del film interfacial y la estabilidad de las emulsiones, (ii) formular emulsiones con distintos antioxidantes (Vit E, B-C, ASX), (iii) obtener microcápsulas de omega-3 y antioxidantes, en polvo mediante la deshidratación de las emulsiones por secado spray y evaluar la eficiencia de encapsulación, y (iv) estudiar la influencia de la temperatura y de la presencia de antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa de las microcápsulas en polvo durante el almacenamiento.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Se utilizaron dos tipos de aceite de chía: aditivado con Vitamina E (200 ppm) y sin aditivar, provisto por la empresa SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina). El aislado de proteínas de suero (WPI – whey protein isolate) fue suministrado por Davisco (Estados Unidos), siendo su composición en base seca (% p/p): proteínas 97.9 %, cenizas 1.9 %, grasas 0.2%.

La muestra comercial de pectina de alto metoxilo (PAM) fue provista por Gelfix (Argentina).

La inulina (Orafti HSI) fue gentilmente donada por el Grupo Saporiti S.A. (Argentina), mientras que la muestra de maltodextrina (MDX) DE 15 fue donada por Productos de Maiz S.A. (Buenos Aires, Argentina).
Para evaluar la influencia de la incorporación de antioxidantes en la formulación de las microcápsulas de aceite de chía se utilizó una muestra pulverizada de comprimidos comerciales conteniendo cada 100 g los siguientes compuestos antioxidantes: 5.6 g de B-C, 1.9 g de bixa orellana, 1.25 g vitamina C, 62 mg luteína, 62 mg licopeno (Laboratorios Del Bel S.R.L., Argentina).
También como antioxidante se utilizó polvo de algas (Haematococcus Pluvialis) que contiene 5% de astaxantina provisto por Prescribed for Life (China). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

2.2. Preparación de emulsiones para evaluación de concentración de PAM

Se mezclaron 10% de fase oleosa (AC) y 90% de fase acuosa conteniendo WPI, PAM e Inulina/MDX a pH 7, en las siguientes proporciones: 20 g aceite de chía + 30 g WPI 6% + 30 g PAM (0.9 - 1.8%) + 120 g Inulina 37.5%, agitando en un equipo Ultraturrax T-25 (IKA, Alemania) durante 2 min a 12000 rpm. Luego se procesaron en un homogeneizador ultrasónico Mod. VC-505 (Sonics & Materials, USA) en modo duty cycle (1 seg ON, 1 seg OFF) a 40% de amplitud durante 4.5 min, en baño de hielo y con agitación magnética. Se ajustó el valor de pH a 5 para favorecer la formación de la doble capa interfacial entre el WPI y la PAM por interacciones electrostáticas.
La composición final teórica de las emulsiones fue (% p/p): 10% AC, 1% WPI, 0.15%-0.3% PAM, 25% Inulina/MDX (como material de relleno). Se variaron las concentraciones de PAM para evaluar su influencia en la formación de la bicapa interfacial WPI-PAM alrededor de las gotas de aceite.

2.3. Caracterización de emulsiones

2.3.1. Microscopía óptica

Las emulsiones se observaron en un microscopio óptico en aumentos de 40X y 100X (Leica Microsystems, Alemania) y se tomaron fotografías de los más representativos (Fioramonti et al., 2019).

2.3.2. Distribución de tamaño de gota

Se realizaron determinaciones de distribución de tamaños de gota por dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). Las muestras se diluyeron 1/70 en solución de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 0.1%. El tamaño de gota se analizó mediante la distribución de tamaños de partículas y el diámetro promedio (Z-average) basada en intensidad. Por cada muestra se realizaron al menos cinco mediciones a 25°C (Fioramonti et al., 2019).

2.3.2. Determinación de potencial Z

Se midió utilizando un equipo Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). La emulsión fue previamente diluida 1/70 con buffer citrato pH 5. Las mediciones de potencial zeta se informaron como el promedio y la desviación estándar de cinco determinaciones (Fioramonti et al., 2019).

2.3.3. Estabilidad de las emulsiones frente al cremado

Las emulsiones frescas fueron colocadas en tubos de 10 mL y fueron almacenadas a temperatura ambiente (25°C) durante un mes para evaluar cualitativamente su desestabilización por cremado.

2.4. Preparación de emulsiones con agregado de antioxidantes.

Una vez seleccionada la concentración de PAM más apropiada para la formación de la doble capa, se procedió a evaluar la estabilidad oxidativa que podrían aportar los antioxidantes naturales antes mencionados.
Para ello, las emulsiones se prepararon como se menciona en el punto 2.2., pero antes se agregaron en la fase oleosalos antioxidantes en las siguientes proporciones: 20g de vit E, 1.8g de B-C o 0.18g de ASX, cada 100 g aceite, respectivamente.
Desafortunadamente, en esta instancia del trabajo experimental, existieron problemas con el abastecimiento de inulina, por lo que se debió cambiar el material de relleno a maltodextrina (MDX)

2.5. Obtención de las microcápsulas en polvo

Las microcápsulas de AC en polvo se obtuvieron mediante la deshidratación de las emulsiones en un secador spray (Yamato ADL311S, China). Para ello se utilizaron las siguientes condiciones operativas: T_{inlet} = 170°C, T_{outlet} = 85°C - 95°C, caudal de aire=0.04 m^3/min, caudal de muestra = 3 mL/min. Una vez obtenidas, las microcápsulas en polvo se almacenaron en recipientes herméticos, cubiertos con papel aluminio a temperatura ambiente (30°C) y a temperatura de heladera (4°C).

2.6. Caracterización de emulsiones y polvos con antioxidantes

2.6.1. Determinación del índice de peróxidos (IP)

Para la determinación del índice de peróxidos se utilizó el método oficial de la International Association of Fish Meal Manufacturers (IAFMM). Para ello, 14 mL de emulsión o 14 mL de emulsión reconstituida con agua destilada a partir de los polvos, se extrajeron con 28 mL de isooctano/isopropanol (3:2), la mezcla se

homogeneizó 2 veces en un vortex durante 30 s, y luego se centrifugó durante 15 min a 3500 rpm. Posteriormente, se tomaron 6.5 mL de la fase superior orgánica y se adicionaron a 5 mL de una mezcla acético:cloroformo (3:2), agitando el recipiente para que la muestra se disuelva. Luego se agregó 1 mL de solución de ioduro de potasio saturada y se dejó reaccionar el sistema en oscuridad durante 5 min. Finalmente, se agregaron 10 mL de agua destilada y 1 mL de solución de almidón 0.5% (indicador). Las muestras se titularon con tiosulfato de sodio 0.01 N adicionándolo gradualmente y agitando vigorosamente hasta la desaparición del color azul.
El índice de peróxidos se calculó usando la siguiente ecuación:
IP = S x N x 1000 / A (meq peróxido/Kg aceite) (Ec. 1)
Donde S es el volumen de titulación de la muestra (en mL), N es la normalidad de la solución de tiosulfato de sodio y A es la masa de aceite titulada en gramos.
Se realizó un blanco de reactivos, y se restó el volumen gastado al resto de las muestras.

2.6.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para esta determinación se siguió el protocolo descripto en Klinkesorn et al. (2005). En primer lugar, se preparó una solución de reactivos mezclando 15 g de ácido tricloroacético (TCA), 0.375 g de ácido tiobarbitúrico (TBA), 1.76 mL de HCl 10 N y 82.9 mL de agua destilada. A las emulsiones y a las emulsiones reconstituidas se les realizó el mismo paso de extracción detallado en el apartado 2.6.1, con la mezcla isooctano:isopropanol. Luego de la centrifugación, se tomó 1 mL de la fase orgánica superior (isooctano) y se agregaron 2 mL de la solución TCA-TBA, la mezcla homogeneizó en un vortex y se incubó en un baño de agua a 90°C durante 15 min. Luego, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugaron a 3000 g durante 15 min. La absorbancia del sobrenadante se registró a 532 nm y se determinó la concentración de TBARS mediante una curva de calibrado construida a partir de diluciones de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Abs532 nm = 73240 [mL/mmol MDA] x Concentración MDA [mmol MDA/mL]). La concentración de TBARS (compuestos secundarios de oxidación) se expresó según la ecuación:

TBARS = (C x 2 x 1000)/A (mmol MDA/Kg aceite) (Ec. 2)

Donde C es la concentración de malondialdehído (MDA) calculada con la curva de calibrado, el valor numérico 2 tiene en cuenta los mL del volumen de reacción, A es la masa de aceite en gramos contenida en la muestra, y el factor 1000 es para expresar el resultado en Kg de aceite.

2.6.3. Eficiencia de encapsulación

En primer lugar, se determinó el contenido de aceite libre (AL) – no encapsulado. Para ello, se extrajeron 2 g de muestra con 15 mL de éter de petróleo y la mezcla se homogeneizó lentamente durante 3 min. Luego, el sistema se dejó decantar, el sobrenadante se pasó a través de un papel de filtro, y se recuperó en un balón de destilación. Finalmente, el éter de petróleo se evaporó en un evaporador rotatorio a 60°C y el extracto libre de solvente se secó en estufa a 105°C durante 20 minutos para eliminar el vapor de agua residual. El contenido de aceite libre se determinó por gravimetría (Fioramonti et al., 2019). El aceite total (AT) se asumió que fue igual al aceite inicial agregado a la formulación ya que, al tratarse de un compuesto no volátil, se espera que no se pierda por evaporación de las emulsiones en el secado spray (Carneiro et al., 2013).
Para evaluar el grado de protección del aceite dentro de la microcápsula, se determinó la eficiencia de encapsulación (%EE), a partir de las determinaciones mencionadas anteriormente. La eficiencia de encapsulación se calculó mediante la siguiente fórmula:

%EE = [AT (g/100 g polvo) - AL (g/100 g polvo)] / [AT (g/100 g polvo)]
(Ec. 3)

2.7. Análisis de datos

Todas las emulsiones y las microcápsulas en polvo fueron formuladas por replicado. Todas las determinaciones analíticas fueron realizadas al menos por duplicado. Los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar fueron calculados y presentados en tablas y gráficas como pares de coordenadas acompañadas por su correspondiente barra de error. Para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos se aplicó el Análisis de la Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia a=0,05, utilizando el programa Statgraphics Centurion XV. En los casos en donde se violaban alguno de los supuestos del ANOVA (homogeneidad de varianzas) se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y los gráficos de caja y bigotes, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ (Montgomery y Runger, 2003).
Además, se utilizó el programa OriginLab 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) para la representación gráfica de los datos.

3. Resultados y Discusión

3.1. Microscopía óptica.

Uno de los factores que influyen en la estabilidad de las emulsiones es el espesor de la membrana interfacial ya que, bajo ciertas circunstancias, se ha

encontrado que las emulsiones multicapa suelen tener una mayor estabilidad frente a condiciones de estrés que las emulsiones aceite en agua monocapa convencionales (Guzey y McClements., 2006).

Para generar las emulsiones multicapa, en este trabajo se estudió cómo influye la concentración de PAM, en la formación de la doble capa interfacial mediante interacciones electrostáticas.

En la Fig. 1 se observan las micrografías de las emulsiones con distintas concentraciones de PAM.

En los sistemas formulados sin PAM, las gotas de emulsión permanecieron separadas unas de otras, sin formar agregados.

Por su parte, en las emulsiones con 0.15% de PAM, se observó la presencia de flóculos de gran tamaño. En este caso, si la concentración utilizada de PAM no fuera suficiente para saturar completamente la interfase proteica, podría haberse promovido el fenómeno de floculación "por puentes", donde una única molécula de polisacárido se adsorbería a la superficie de dos gotas de emulsión. Como consecuencia de la aproximación de las gotas a distancias más cortas, podrían haberse favorecido las fuerzas atractivas de Van der Waals entre las moléculas, dando lugar a la formación de agregados (Fioramonti et al., 2015b).

Sin embargo, este efecto parece haberse revertido al agregar una mayor concentración de PAM a la formulación (0.3%), tal y como se observa en la última micrografía. En este caso, la cantidad de polisacárido habría sido suficiente para recubrir completamente la superficie de las gotas de emulsión, que permanecieron separadas unas de otras. Vale aclarar que los flóculos que se observaron por microscopía en las emulsiones conteniendo 0.15% PAM, no se detectaron en las medidas de tamaño por DLS, ya que, en ese caso, los sistemas habían sido previamente diluidos 1/70 en solución de SDS, lo que promovió la disrupción de los flóculos, para analizar los tamaños de gotas individuales.

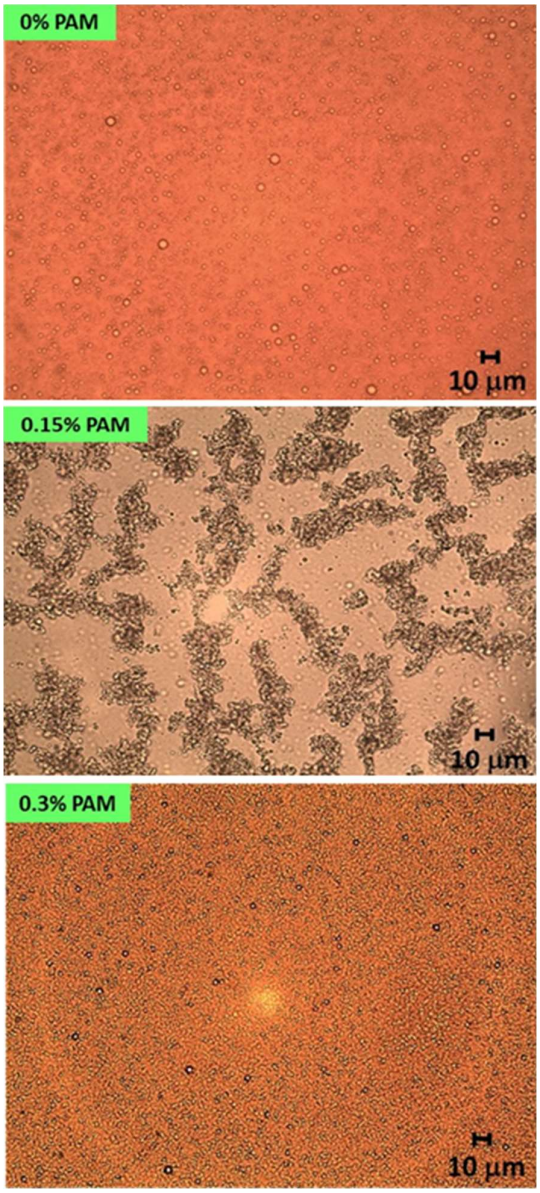


Figura 1 Micrografías de emulsiones de AC a pH 5, con concentraciones variables de PAM (0-0.3%)

3.2. Distribución de tamaño de gota

En la distribución de tamaños de gota por intensidad (Fig. 2A), en todos los sistemas con distintas concentraciones de PAM, se pueden observar dos poblaciones principales de gotas, con picos no resueltos completamente. La primera población presenta tamaños de gota alrededor de los 200 nm, mientras que los picos de las poblaciones de gotas más grandes se ubicaron alrededor de los 800 - 1000 µm respectivamente. Si bien no se observaron grandes diferencias entre las emulsiones con distintas concentraciones de PAM, se puede notar que aquellos sistemas preparados con 0.15% presentaron una mayor polidispersidad de tamaños principalmente en la población de gotas más

grandes. Esto podría deberse a la presencia de pequeños flóculos que no hayan sido dispersados por la dilución de los sistemas en SDS, previo a las mediciones en DLS.

Por otro lado, teniendo en cuenta que en DLS, la mayor intensidad de luz dispersada por las gotas de mayor tamaño podrían enmascarar la baja intensidad de luz dispersada por las gotas más pequeñas, se decidió analizar también la distribución de tamaños de gota en número. Es importante resaltar que la técnica de medición de DLS genera primeramente una distribución de intensidades con los datos de energía de luz dispersada que llegan al detector durante la medición. Esta información, el software puede convertirla luego a una distribución en número.

En la Fig. 2B se muestra esa transformación de los datos, donde se observa, para todas las concentraciones de PAM evaluadas, una única población de gotas alrededor de 200 nm, con una polidispersidad que varió en un rango de 60-900 nm. Teniendo en cuenta estos resultados, podría afirmarse que las emulsiones obtenidas presentaron predominantemente tamaños de gota inferiores a 900 nm.

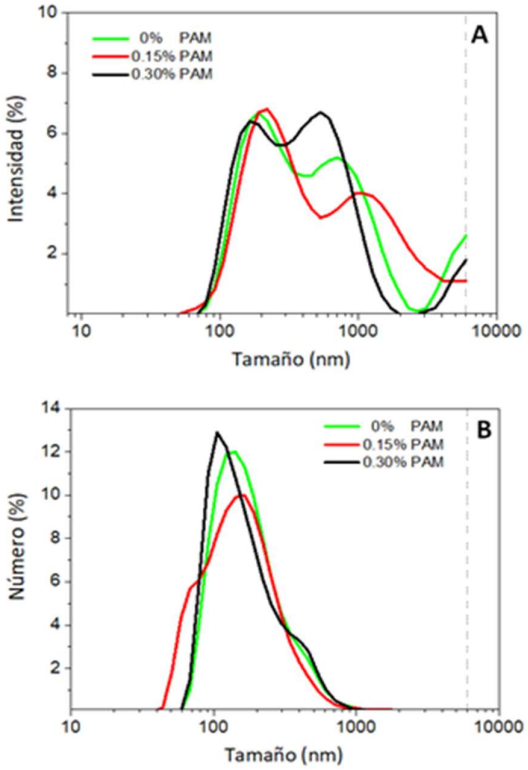


Figura 2.: Distribución de tamaños de gota en Intensidad (A) y en Número (B) de emulsiones de AC con la siguiente composición: 10% aceite, 1% WPI, 25% Inulina, pH 5, variando la concentración de PAM de 0-0.3%.

Si bien las distribuciones en número pueden contribuir a brindar información complementaria acerca de los sistemas evaluados, se debe tener cierta precaución al analizarlas, ya que cuando se calculan diámetros medios ponderados en número, las gotas pequeñas adquieren mayor importancia que las más grandes (Fioramonti et al., 2015a; Bhattacharjee et al., 2016).

3.3. Potencial Z

A continuación, se evaluó la formación de la bicapa interfacial WPI-PAM y la estabilidad coloidal de los sistemas a través de la determinación del potencial zeta en la superficie de las gotas (Fig. 3).

Para la formación de una doble capa interfacial alrededor de la gota de emulsión, las proteínas del lactosuero (WPI) estructuradas en la interfase aceite-agua deben presentar cargas eléctricas opuestas al biopolímero que va a constituir la segunda capa – en este caso la PAM – de manera que puedan interaccionar entre ellos por fuerzas de atracción electrostáticas (McClements y col., 2007). Estas interacciones dependen tanto del pH del medio circundante - ya que éste determina la carga neta de los biopolímeros - como de la concentración de los biopolímeros.

En este sentido, es importante resaltar que las PAM tienen una leve densidad de carga neta negativa relativamente constante en un amplio rango de pH (pH > 3), debido a la presencia de grupos -COOH libres en su estructura.

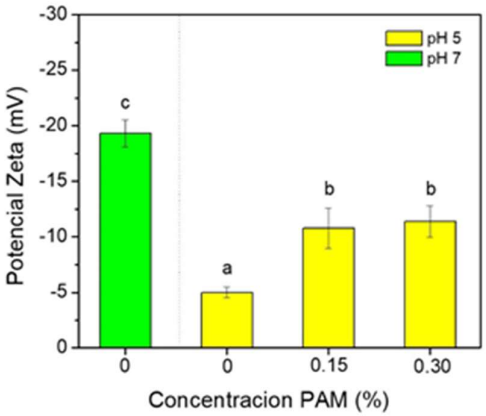


Figura 3: Efecto de la concentración de PAM sobre el potencial zeta de emulsiones 10% aceite, 1% WPI, 25% Inulina, a pH 5 y pH 7. Las letras distintas representan diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

Por su parte, las proteínas se comportan como anfolitos variando su densidad de carga frente a cambios de pH, debido a la contribución individual de cada uno de sus aminoácidos a la carga neta total de la macromolécula. En este sentido, la carga total del WPI va a estar principalmente influenciada por los puntos isoeléctricos (pI) de sus proteínas mayoritarias: la β-lactoglobulina (pI: 4.7-5.2) y la α-

lactoalbúmina (pI: 4.2-4.5) (Fessas et al., 2001; Bramaud et al., 1995).

A valores de pH superiores al pI, las proteínas presentarán una densidad de carga neta negativa. Sin embargo, a medida que el pH se aproxime al valor del pI, la carga neta de las proteínas tenderá a cero; mientras que a valores de pH por debajo del pI las proteínas exhibirán una densidad de carga neta positiva (Fenemma, 2010).

Por experiencias previas (Fioramonti et al., 2015a, 2019), se eligió el valor de pH 5 para diseñar las emulsiones doble capa WPI-PAM de aceite de chía.

En la Fig. 3 puede observarse que el valor absoluto del potencial Z de las emulsiones monocapa conteniendo sólo WPI, disminuyó desde un valor cercano a -20 mV hasta -5 mV cuando el pH varió de 7 a 5. Este comportamiento podría ser atribuido a la variación de la carga neta de las proteínas del WPI adsorbidas en la superficie de las gotas, la cual se aproximaría a valores cada vez más cercanos a la neutralidad en las proximidades del punto isoeléctrico de las proteínas (Pongsawatmanit y col., 2006).

Con el agregado de la PAM en ambas concentraciones (0.15 y 0.3%), las emulsiones a pH 5 presentaron valores de potencial zeta significativamente más negativos que sus correspondientes emulsiones sólo con WPI, lo que estaría indicando la adsorción del polisacárido a la proteína estructurada en la superficie de las gotas para formar la doble capa interfacial WPI-PAM. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que, si bien a estos valores de pH las emulsiones primarias presentaron una leve densidad de carga neta negativa, en la superficie proteica se exponen segmentos con carga positiva que podrían interaccionar con los grupos carboxilo cargados negativamente presentes en las cadenas de PAM, promoviendo la formación de la bicapa (Jones & McClements, 2011; Fioramonti et al., 2019).

Algunos trabajos en la bibliografía consideran los sistemas coloidales con valores absolutos de potencial zeta entre 10-20 mV como moderadamente estables, debido a la leve repulsión electrostática entre las partículas para evitar la formación de flóculos y/o agregados (Guzey & McClements, 2004; Bhatacharjee, 2016). Sin embargo, la estabilidad coloidal depende no solamente de la repulsión electrostática, sino también de otros factores, entre ellos, la repulsión estérica entre las gotas que podría ser estimulada por las macromoléculas de pectina debido a su gran tamaño.

Respecto de la presencia de inulina en las formulaciones, vale aclarar que, al ser un polisacárido neutro (no presenta grupos cargados) que no posee actividad superficial - es decir, no se adsorbe a la interfase aceite-agua - este compuesto no interferiría en la formación de la bicapa interfacial sino que su función principal es como material de relleno que luego pasa a formar parte de la pared de las microcápsulas, una vez deshidratadas las emulsiones (Gharsallaoui et al., 2007). Por lo tanto, no tendría un efecto importante sobre el potencial zeta de los sistemas. Esto se verificó realizando mediciones de potencial zeta de emulsiones de aceite de chía doble capa WPI-PAM sin inulina. Estos sistemas presentaron un valor de potencial zeta de -13.50 ±0.79 mV, que coincide con los valores observados en la Fig. 3 para las emulsiones doble capa WPI-PAM con inulina.

En el diseño de emulsiones de aceite de lino doble capa WPI-Alginato de sodio reportado por Fioramonti et al. (2015a) también se observó que el agregado de maltodextrina al 20% (otro polisacárido neutro, sin cargas) en la formulación, no influyó sobre el potencial zeta de la bicapa interfacial formada por los electrolitos.

3.4. Índice de cremado

Para cada emulsión se evaluó la desestabilización por cremado de forma cualitativa, como un parámetro de la estabilidad global de los sistemas en un intervalo de tiempo prolongado. Los resultados de estas observaciones macroscópicas se presentan en la Fig. 4.

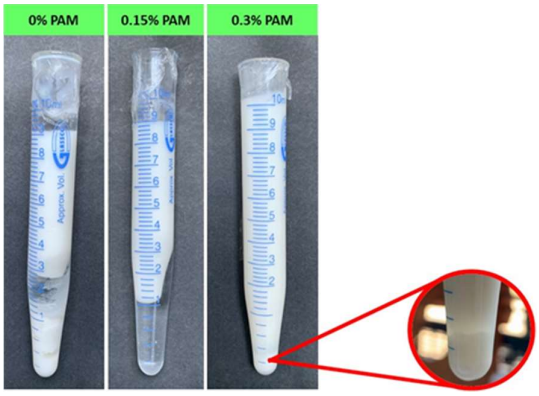


Figura 4. Fotografías de emulsiones 10% aceite, 1% WPI, 25% Inulina, pH 5, formuladas con concentraciones variables de PAM (0-0.3%), almacenadas durante 1 mes a temperatura ambiente.

En primer lugar, en la emulsión formulada sin PAM, se registró una separación de fases luego del almacenamiento. Por un lado, se observa una fase crema en la parte superior del tubo, una región clarificada en el medio y un precipitado blanco en la parte inferior. Si bien en estas emulsiones recién preparadas se vio al microscopio que las gotas permanecieron separadas unas de otras, el bajo valor de potencial zeta (-5 mV) y la ausencia de PAM podrían haber promovido la atracción de las gotas durante el almacenamiento con la consecuente formación de flóculos que, al tener un mayor tamaño, habrían cremado más rápido que las gotas individuales formando una fase compacta en la parte superior del tubo (Fioramonti et al., 2015b). Y el

precipitado blanco formado en la parte inferior podría deberse a la cristalización gradual de las moléculas de inulina durante el almacenamiento, ya que la estructura de la inulina cristalina es energéticamente más favorable que la inulina amorfa (Glibowski et al., 2014).

Por otro lado, cuando se agregó 0.15% PAM a la formulación, también se observó una separación de fases, con la formación de una crema compacta en la parte superior y una fase suero completamente límpida en la parte inferior, sin la presencia de ningún precipitado. Estos resultados son consistentes con los observados por microscopía (Fig. 1), ya que las emulsiones frescas preparadas a pH 5 presentaron una gran cantidad de flóculos, que habrían cremado rápidamente, sin darle tiempo a la inulina para reordenarse en la fase acuosa y cristalizar. En el sistema 0% PAM, la formación gradual de los flóculos durante el almacenamiento, le habría proporcionado el tiempo necesario a las moléculas de inulina para reordenarse y cristalizar formando un precipitado.

Finalmente, las emulsiones conteniendo 0.3% de PAM fueron las más estables al fenómeno de desestabilización por cremado, ya que a simple vista, no se observa una separación de fases macroscópica. Este comportamiento es consistente con la presencia de gotas individuales observadas al microscopio que serían más estables coloidalmente por el valor de potencial zeta (-10 mV) y la repulsión estérica promovida por la doble capa interfacial de PAM sobre la superficie de las gotas. En consecuencia, estos sistemas tardarían más tiempo en cremar en comparación con los sistemas floculados.

Sin embargo, en el fondo del tubo de estas emulsiones (0.3% PAM) también se observó la presencia de un precipitado blanco que, como se dijo anteriormente, estaría relacionado con la cristalización de las moléculas de inulina durante el almacenamiento.

De los ensayos realizados en esta primera sección se observó que: (i) Mediante el proceso de emulsificación en 2 etapas se lograron obtener emulsiones de aceite de chía con la mayor proporción de tamaños de gota en el rango de 50-1000 nm, y no se observaron grandes diferencias en las emulsiones con distintas concentraciones de PAM. (ii) Se formó la doble capa interfacial WPI-PAM a pH 5. (iii) Las emulsiones formuladas con 0.3% PAM fueron más estables que las formuladas con 0.15% PAM. (iv) El proceso de emulsificación no tuvo un efecto significativo en la estabilidad oxidativa del aceite de chía.

Por lo tanto, se seleccionó la concentración 0.3% de PAM para continuar con el trabajo de investigación y obtener las microcápsulas en polvo.

3.5. Caracterización de microcápsulas en polvo

3.5.1. Eficiencia de encapsulación

Se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) para evaluar el grado de protección del aceite de chía dentro de la microcápsula. Además, se evaluó si el agregado de antioxidantes en la formulación tenía influencia sobre la EE.

En la Tabla 1 se presentan los valores de Sólidos Totales (ST) de las emulsiones, y de aceite total (AT), aceite libre (AL) y eficiencia de encapsulación (EE) para cada polvo evaluado.

Tabla 1. Influencia de la adición de una mezcla de antioxidantes en el contenido de AL y en la EE del AC en las microcápsulas en polvo.

Formulación	Control	Vitamina E	Betacaroteno	Astaxantina
ST (g/100g emulsión)	33.70	33.70	36.92	36.93
AT (g/100g polvo)	29.67	29.67	30.66	27.07
AL (g/100g polvo)	14.64 ± 1.07^{a}	14.64 ± 1.07^{a}	10.01 ± 1.49^{b}	9.69 ± 0.55^{b}
EE	50.65 ± 3.62^{a}	50.65 ± 3.62^{a}	67.35 ± 4.86^{b}	63.48 ± 2.00^{b}

Las letras diferentes representan diferencias significativas (comparación horizontal) según test LSD ($p<0.05$)

En las formulaciones con B-C y ASX el porcentaje de ST fue mayor, lo cual tuvo un efecto significativo ($p<0.05$) sobre la eficiencia de encapsulación, ya que estos sistemas presentaron menores valores de AL y una mayor EE, respecto de los demás.

Estas observaciones serían consistentes con lo propuesto por Gharsallaoui et al. (2007), quienes sugieren que la EE podría incrementarse aumentando la concentración sólidos totales en las emulsiones, ya que los mismos luego pasan a formar parte de la estructura de pared de las microcápsulas en polvo, contribuyendo con la matriz de soporte que las recubre.

3.5.2. Índice de peróxidos

Las microcápsulas en polvo fueron almacenadas durante 8 semanas a temperatura ambiente (30°C) y de heladera (4°C), al resguardo de la luz, y se evaluó la estabilidad del aceite de chía frente a la degradación oxidativa. La Fig. 5 muestra la evolución del IP del aceite encapsulado luego de

8 semanas a las dos temperaturas de almacenamiento.

Se puede observar que a 4°C todos los sistemas presentaron valores de IP dentro del rango permitido por el Codex Alimentarius para aceites obtenidos por prensado en frío (<15 meq O_2/kg aceite), mientras que a 30°C se puede observar el efecto protector de los antioxidantes sobre el deterioro oxidativo del aceite, tomando especial relevancia la actividad de la ASX ya que fue el único antioxidante que mantuvo el valor de IP dentro del rango permitido.

Por su parte, Espinaco et al. (2021) estudió el efecto de la ASX sobre el aceite de chía sin encapsular, y luego de 15 días a 25ºC reportaron valores de IP superiores a los permitidos (20 - 30 meq O_2/kg aceite). Esto permite observar la importancia de la microencapsulación. Además Martinez et al. (2015) microencapsularon AC por secado spray con extracto de romero como antioxidante, y luego de 60 días informaron valores de IP superiores a los reportados en este trabajo con ASX (alrededor de 20 meq O_2/kg aceite).

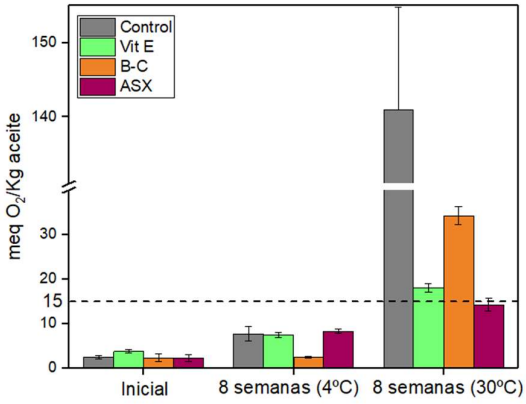


Figura 5. Efecto de los antioxidantes y de la temperatura de almacenamiento en el IP del aceite de chía microencapsulado.

Por otra parte, si bien el valor de IP de los polvos con Vit E luego de 8 semanas y a 30ºC, apenas sobrepasan el valor permitido, la proporción de antioxidante utilizado es 100 veces más que la de ASX. A esta temperatura, toma mayor importancia el uso de los antioxidantes, ya que como se observa en el gráfico, el control tiene un valor de IP aproximadamente 10 veces mayor al permitido.

3.5.2. TBARS

En la figura 6 podemos observar que los antioxidantes y la temperatura tuvieron un efecto significativo sobre el índice de TBARS. Se observó la misma tendencia que con el IP, donde las muestras refrigeradas se mantuvieron muy por debajo del límite aconsejado (<1mmol MDA/Kg aceite). Si bien a 30 °C, tanto la vit E como la ASX, lograron mantener la oxidación del aceite por debajo del límite aconsejado, los polvos con ASX presentaron un valor considerablemente menor. Resultados similares fueron hallados por Espinaco et al. (2021).

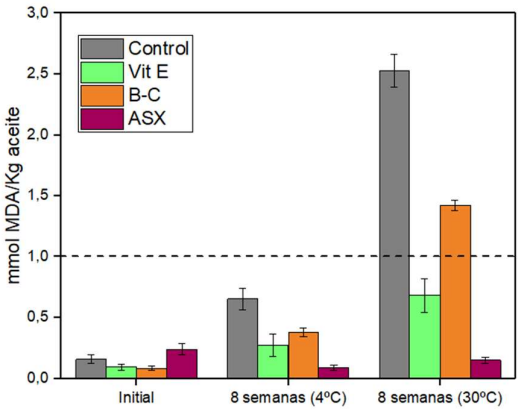


Figura 6. Efecto de los antioxidantes y de la temperatura de almacenamiento en el índice de TBARS del aceite de chía microencapsulado.

4. Conclusiones

Se logró obtener una formulación apropiada para encapsular aceite de chía, la cual se utilizó para obtener microcápsulas con antioxidantes por secado spray.

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podría decirse que el factor que tiene mayor influencia sobre la oxidación del aceite de chía es la temperatura. Sin embargo, es significativa la actividad de los antioxidantes respecto del control, principalmente cuando se conserva a 30 ºC. Este resultado es interesante si se busca la aplicación de estas microcápsulas en productos de conservación a temperatura ambiente.

Respecto de los antioxidantes utilizados, podría decirse que el más efectivo para evitar el deterioro oxidativo del aceite de chía fue la astaxantina.

5. Referencias

Bhattacharjee, S. (2016). *DLS and zeta potetial – What they are and what they are not?* Journal of Controlled Release, 235, 337-351.

Bramaud, C, Aimar, P, Daufin, G. (1995). *Thermal isoelectric precipitation of α-lactalbumin from a whey protein concentrat*e: Influence of protein–calcium complexation. Biotechnology and Bioenginering. 47(2),121-130.

Cámpora M.C. (2016). *Alimentos funcionales: tecnología que hace la diferencia*. Revista de Investigaciones Agrarias INTA, 131–137.

Carneiro, HCF, Tonon, RV, Grosso, CRF, Hubinger, MD. (2013). *Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials.* Journal of Food Engineering, 115, 443-451.

Chawda, P, Shi, J, Xue, S, Quek, Y. (2017). *Co-encapsulation of bioactives for food applications.* Food Quality and Safety, 1(4), 302-309.

Codex Alimentarius Commission (2012). Codex Alimentarius Commission. Codex Stan 19. Edible fats and oils not covered by individual standards. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do

Espinaco, B. Y., Niizawa, I., Marino, F., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2021). *Storage stability of chia (Salvia hispanica L.) oil incorporated with astaxanthin.* Journal of Food Processing and Preservation, 45(2), e15184.

Fennema, O. (2010). *Química de los Alimentos.* Acribia Editorial (Zaragoza). 3a ed. 1167p.

Fessas, D, Iametti, S, Schiraldi, A, Bonomi, F. (2001). *Thermal unfolding of monomeric and dimeric b-lactoglobulins.* European Journal of Biochemistry, 268, 5439-5448.

Fioramonti, SA, Arzeni, C, Pilosof, AMR, Rubiolo, AC, Santiago, LG. (2015a). *Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions.* Journal of Food Engineering, 156, 31-38.

Fioramonti, SA, Martínez, MJ, Pilosof, AMR, Rubiolo, AC, Santiago, LG. (2015b). *Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil microencapsulation: Effect of pH and alginate concentration.* Food Hydrocolloids, 43, 8-17.

Fioramonti, S.A., Stepanic, E.M., Tibaldo, A.M., Pavón, Y.L., Santiago, L.G. (2019). *Spray dried flaxseed oil powdered microcapsules obtained using milk whey proteins-alginate double layer emulsions: Effect of low homogenization pressure and oxidative stability during storage.* Food Research International 119, 931-940.

Gharsallaoui, A, Roaudant, G, Chambin, O, Voilley, A, Saurel, R. (2007). A*pplications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.* Food Res. Int., 40, 1107-1121.

Glibowski, P., Pikus, S., Jurek, J., & Kotowoda, M. (2014). *Factors affecting inulin crystallization after its complete dissolution*. Carbohydrate polymers, 110, 107-112.

Guzey, D., Kim, H. J., & McClements, D. J. (2004). *Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β-lactoglobulin–pectin membranes.* Food Hydrocolloids, 18(6), 967-975.

Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). *Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry.* Advances in colloid and interface science, 128, 227-248.

International Association of Fish Meal Manufacturers (IAFMM) (1981). Fish oil Bulletin N°7: *Método de análisis recomendado para la determinación del valor peróxido en aceites de pescado*. Pág 2

Jones, OG, McClements, DJ. (2011). *Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes.* Advances in Colloid and Interface Science,167, 49-62.

Kamezaki, C, Nakashima, A, Yamada, A, Uenishi, S, Ishibashi, H, Shibuya, N, Hama, S, Hosoi, S, Yamashita, E, Kogure, K. (2016). *Synergistic antioxidative effect of astaxanthin and tocotrienol by co-encapsulated in liposomes.* J. Clin. Biochem. Nutr., 59(2), 100-106.

Klinkesorn, U, Sophanodora, P, Chinachoti, P col. (2005). *Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition.* Food Hydrocolloids. 19: 1044-1053.

Lin, S, Chen, Y, Chen, R, Chen, L, Ho, H, Tsung, H, Sheu, M, Liu, D. (2016). *Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads.* PLoS ONE, 11(4):e0153685.

Marineli, R. da S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica, M. R. (2014). *Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (Salvia hispanica L.).* LWT - Food Science and Technology, 59(2P2), 1304–1310.

Martinez, M. L., Curti, M. I., Roccia, P., Llabot, J. M., Penci, M. C., Bodoira, R. M., & Ribotta, P. D. (2015). *Oxidative stability of walnut (Juglans regia L.) and chia (Salvia hispanica L.) oils microencapsulated by spray drying.* Powder Technology, 270, 271-277.

McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). *Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components.* Journal of food science, 72(8), R109-R124.

Montgomery, D. C. y Runger, G. C. (2003). *Applied Statistics and Probability for Engineers (3rd ed)*. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.

Nishigaki, I, Dmitrovskii, AA, Miki, W, Yagi, K. (1994). *Suppresive effect of astaxanthin complex on lipid peroxidation induced in rats.* J. Clin. Biochem. Nutr. 16, 161-166.

Nishino, H, Murakoshi, M, Xiao, YM, Wada, S, Masuda, M, Ohsaka, Y, et al. (2005). *Cancer prevention by phytochemicals. Oncology, 69, 38-40*

Simopoulos AP. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Exp Biol Med, 233, 674-688.

Pongsawatmanit, R, Harnsilawat, T, McClements, DJ. (2006). *Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β-lactoglobulin.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 287, 59-67.

Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). *Spray-dried encapsulation of chia essential oil (Salvia hispanica L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices.* Journal of Food Engineering, 111(1), 102–109.

Sagalowicz, L., & Leser, M. E. (2010). *Delivery systems for liquid food products.* Current Opinion in Colloid & Interface Science, 15(1-2), 61-72.

Santocono, M, Zurria, M, Berretini, M, Fedeli, D, Falcioni, G. (2006). I*nfluence of astxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells.* J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 85, 205-215.

Simopoulos AP. (2008). *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases.* Experimental Biology and Medicine, 233: 674-688.

Uauy, R., & Dangour, A. D. (2006). *Nutrition in brain development and aging: Role of essential fatty acids.* Nutrition Reviews, 64 (5 SUPPL. 1).

21TCA - Efecto de la cantidad de nuez prensada en la calidad y rendimiento de obtención de aceite de nuez pecán Starking [*Carya illinoinensis* (Wangenh.) K.Koch]

Effect of the amount pressed nut on the quality and yield of obtaining Starking pecan oil [Carya illinoinensis (Wangenh.) K.Koch]

Marina Panozzo[1]; Luz Marina Zapata [2]; Andrea Biolatto[3]; Santiago Araujo[3]; Francisco Federico[3]

1. INTA EEA Concordia. CC 34. Concordia, Entre Ríos.
2. Laboratorio de Análisis de Metales en Alimentos y Otros Sustratos (LAMAS) de la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos. Entre Ríos, Argentina.
3. INTA EEA Concepción del Uruguay.
   Correo electrónico de contacto: panozzo.marina@inta.gob.ar

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto del tamaño de la muestra, en la etapa de prensado, en el rendimiento y cantidad de finos presentes en aceite de nuez pecán. Se elaboró aceite de nuez pecán de la variedad Starking con una prensa hidráulica abierta empleando 3 tamaños de paquetes (1,0kg, 1,5Kg y 2,0kg). Para cada paquete se cuantificó el rendimiento de extracción de aceite y la proporción de finos presentes en dichos aceites. Además, se determinó la humedad inicial de las nueces, su contenido de aceite y perfil de ácidos grasos. La humedad inicial fue de 5,25±0,42% mientras que el contenido graso fue 72,7±0,4g/100g. Los ácidos grasos predominantes en el aceite fueron los insaturados oleico y linoleico. El contenido de finos en los tratamientos de 1,0; 1,5 y 2,0 kg fue 0,79±0,04; 0,87±0,07 y 1,05±0,16%, respectivamente; mientras que los rendimientos de aceite fueron: 43,52±1,76%, 39,03±2,35% y 35,37±1,36%. En el tratamiento de 1,0 kg se obtuvo un 18% más de aceite y 31% menos de finos que en el tratamiento de 2,0kg. Se concluye que el contenido de finos en los aceites y el rendimiento de extracción dependieron de la cantidad de nuez pecán introducida en la prensa.

Palabras clave: sedimentos, salud, calidad organoléptica.

Abstract

The present work aimed to study the effect of the sample size, in the pressing stage, on the yield and quantity of fines present in pecan oil. Pecan oil of the Starking cultivar was produced with an open hydraulic press using 3 pack sizes (1.0kg, 1.5Kg and 2.0kg). The oil extraction performance and the proportion of fines present in said oils were quantified for each package. In addition, the initial moisture of the nuts, their oil content and fatty acid profile were determined. The initial humidity was 5.25 ± 0.42% while the fat content was 72.7 ± 0.4g / 100g. The predominant fatty acids in the oil were the unsaturated oleic and linoleic. The content of fines in the treatments of 1.0; 1.5 and 2.0 kg was 0.79 ± 0.04; 0.87 ± 0.07 and 1.05 ± 0.16%, respectively; while the oil yields were: 43.52 ± 1.76%, 39.03 ± 2.35% and 35.37 ± 1.36%. In the 1.0 kg treatment, 18% more oil and 31% less fines were obtained than in the 2.0 kg treatment. It is concluded that the content of fines in the oils and the extraction performance depended on the amount of pecan nut introduced into the press.

Keywords: sediments, health, organoleptic quality.

1. Introducción

La elaboración de aceite de nuez pecán es una alternativa de agregado de valor en la cadena productiva de este fruto seco, debido al creciente interés de la población por el consumo de alimentos que contengan compuestos con propiedades beneficiosas para la salud (Rivera-Rangel *et al*., 2018). Este aceite tiene un potencial importante, ya que es rico en vitamina E y en ácidos grasos insaturados, beneficiosos para la salud, como ácidos oleico y linoleico (Panozzo *et al*., 2018). Su sabor es neutro y está considerado como un producto gourmet (Marchetti *et al*., 2018), pudiendo ser utilizado tanto en preparaciones dulces como saladas.

Actualmente Argentina produce aceite de nuez pecán en baja escala. Sin embargo, en los últimos años, el cultivo comercial del pecán ha crecido exponencialmente, lo que permitirá a mediano plazo ubicar a la Argentina como uno de los tres principales productores mundiales de este fruto seco y como el principal exportador mundial de productos en base a pecán con alto valor agregado (Frusso, 2014). La producción de nuez pecán en Argentina se encuentra cercana a las 3000 t. Las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires concentran el 64 % de la superficie implantada en el país, con 6000 ha y el 80 % de la producción; ascendiendo la misma a 2400 t de pecanes. Otras provincias que siguen en orden de importancia en superficie implantada son: Santa Fe, Corrientes y Catamarca (Frusso, 2020).

En el caso de las nueces, la estabilidad de las semillas y de los aceites obtenidos a partir de ellas, depende directamente del manipuleo que ocurre durante el período de la cosecha, procesamiento y almacenaje (García-Pascual *et al*., 2003). Otros factores que influyen son la región de producción, la variedad cultivada y las características del suelo y del clima (Heaton, *et al*., 1977; Rudolph *et al*., 1992; Grauke, *et al*., 2001).

Las principales fuentes de lípidos en la dieta humana son los aceites comestibles, las grasas, la carne, los productos lácteos, el pescado y las nueces. Los aceites y grasas vegetales comestibles son una parte vital de la dieta humana, no solo por sus atributos sensoriales, sino también por proporcionar ácidos grasos esenciales y energía (Dorni *et al*., 2018).

Uno de los factores que afecta negativamente la calidad de los aceites es la presencia de finos. Cuando estos están presentes, inicialmente el aceite se ve opaco y a medida que los finos se van depositando en el fondo de la botella, en ésta se observa una "borra", que al verter el aceite se vuelve a dispersar enturbiándolo.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar cómo afecta el tamaño de la muestra introducida en la prensa en el rendimiento de extracción y en la proporción de finos presentes en los aceites de nuez pecán.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras

Se trabajó con nueces pecán de la variedad Starking sin cáscara, proporcionadas por un productor perteneciente al Cluster de la Nuez Pecán de Entre Ríos. Inicialmente se realizó una selección, eliminando los granos podridos y necróticos.

2.2. Obtención de aceite de nuez pecán y de finos

A continuación, se llevó a cabo el triturado de las nueces, envoltura de las nueces trituradas en tela filtrante, ajuste de temperatura a 35 ± 2 °C y prensado para la obtención del aceite (Figura 1).

Para el triturado de las mitades sanas de nuez pecán se empleó una picadora industrial de acero inoxidable marca Pagani.

El empaquetado se realizó envolviendo las nueces trituradas en telas filtrantes (lienzo natural), según el siguiente esquema:

Tratamiento Starking 1,0 kg: paquetes de 1,0 kg
Tratamiento Starking 1,5 kg: paquetes de 1,5 kg
Tratamiento Starking 2,0 kg: paquetes de 2,0 kg

El atemperado de los paquetes a la temperatura de 35 ± 2 °C se llevó a cabo en estufa Instrumentalia modelo DHG-9240.

Para el prensado se trabajó con una prensa hidráulica abierta (marca Morano) a la que se le adaptó un sistema de platos provistos por IDEM Alimentos S.H. El prensado consistió en tres etapas de compresión sucesivas, según se muestra a continuación.

1- Compresión durante 5 minutos a 100 kgf/cm^2
2- Compresión durante 10 minutos a 200 kgf/cm^2
3- Compresión durante 5 minutos a 300 kgf/cm^2

Al finalizar cada etapa de compresión, se descomprimió la muestra, antes de pasar a la siguiente etapa de compresión. Finalizado el prensado, se tomaron muestras de aceite para determinar el conteniendo finos y muestras de la

torta de prensado (expeller) para cuantificar el contenido de aceite.

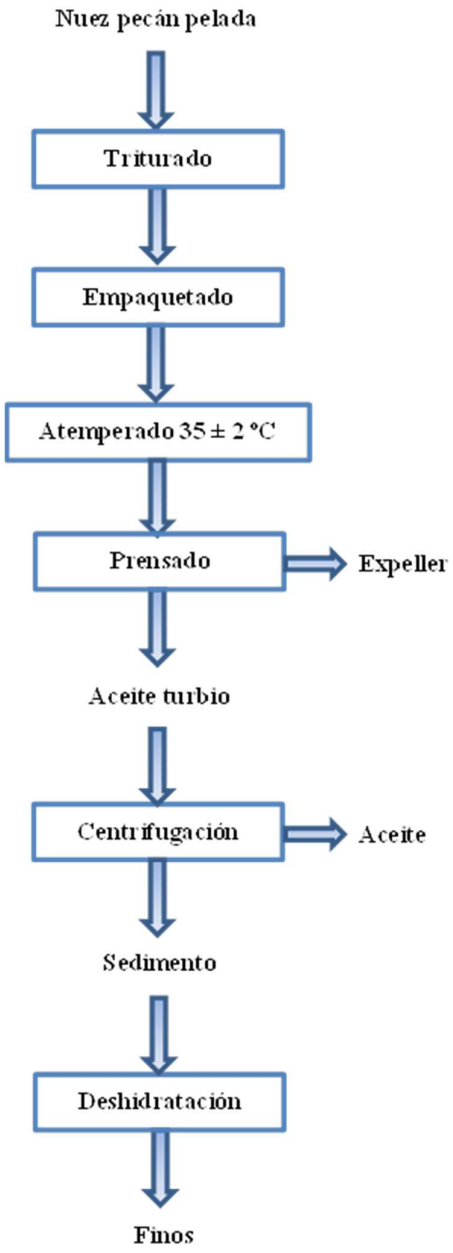


Figura 1: **Flow-sheet obtención de aceite de nuez pecán y de finos.**

2.3 Técnicas analíticas

Humedad. Se cuantificó el contenido de humedad en la nuez pecán según AOAC 925.40.2005.

Contenido de aceite en la nuez pecán y en la torta de prensado. El contenido de aceite en los frutos de nuez pecán y en la torta de prensado se cuantificó mediante análisis de materia grasa (Soxhlet, base seca).

La cantidad total de aceite extraído (% AE) se calculó en base al contenido inicial de aceite en el material de partida (x_i) y al contenido de aceite residual en la torta de prensado (x_f) según la ecuación 1:

$$AE = \frac{x_i - x_f}{x_i} \text{ x } 100 \qquad (1)$$

Contenido de finos. Para la determinación del contenido de finos las muestras se centrifugaron en centrífuga (Themo Scientific Sorvall modelo ST 8) a 4000 rpm por 30 min. El sobrenadante (aceite) fue separado y los sedimentos fueron lavados con ciclohexano, para lo cual se aplicó bortex (marca DeCaLab S.R.L.) durante 1 minuto y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min.

Posteriormente, los sedimentos recuperados se deshidrataron a 40 °C en estufa (Instrumentalia modelo DHG-9240) hasta peso constante. El producto de la deshidratación se denominó "finos".

El contenido de finos se calculó con la Ecuación 2 a partir de los pesos de finos (Pf) y del aceite con finos (Pa+f).

$$\text{Contenido de finos (\%)} = \frac{P_f}{P_{a+f}} \times 100 \qquad (2)$$

Para todos los pesos se utilizó en balanza analítica marca Ohaus modelo Pioneer (sensibilidad 0,0001 g).

Perfil de ácidos grasos en aceite de nuez pecán. La determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de pecán se realizó mediante la síntesis directa de metil ester de ácidos grasos (FAME) acorde a lo publicado por O´Fallon *et al*., (2007). El perfil de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía gaseosa empleando un equipo marca Perkin Elmer, modelo CLARUS 680, equipado con automuestreador Combi PAL. Se utilizó columna capilar HP-88 de 100 m de largo × 0,25 mm de diámetro interno × 0,25 µm de espesor de película. El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: temperatura inicial de 70°C, la que se mantuvo durante 2,5 minutos, posteriormente se aumentó a 165°C a una velocidad de 10 ºC/ minuto y, finalmente a una velocidad de 3 ºC/ minuto se elevó a 240 °C, permaneciendo 10 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas portador a una velocidad de flujo de 1,0 mL/minuto. Tanto el inyector como el detector se mantuvieron a una temperatura de 250 °C. La identificación de los componentes se realizó

comparando los tiempos de retención de los componentes en las muestras con la de aquellos de estándar puro (FAME 37, Supelco Inc. Bellefonte, PA, Estados Unidos). La cuantificación de los componentes se realizó mediante el método de estándar interno, empleando ácido undecanoico. El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos (Maestri *et al*. 1998).

2.4 Análisis estadístico

El contenido de finos y el rendimiento de extracción de aceite se evaluaron mediante Análisis de Varianza y Test de Rango Múltiple con software R versión 3.4.3.

3. Resultados y Discusión

La humedad de las semillas de nuez es un parámetro de calidad que influye en la etapa de recuperación de aceite, ya que no sólo aumenta la plasticidad del material, sino que también contribuye al prensado por su acción lubricante (Martinez *et al*., 2008). Sin embargo, altos contenidos de humedad pueden afectar negativamente la extracción y/o alterar la calidad química del aceite, a través de la hidrólisis de glicéridos con el consiguiente incremento de la acidez (Ixtaina 2010). Se ha observado que la humedad ideal para el prensado de nuez pecán (datos no publicados) es de 5,5 %. La humedad inicial de las nueces trituradas fue de 5,25 ± 0,42 % por lo que no fue necesaria su modificación.

Se señaló en la metodología que las nueces trituradas fueron prensadas en paquetes de 3 tamaños para la obtención de aceites y que estos aceites contenían sedimentos, que fueron separados por centrifugación; obteniendo por un lado los aceites y por otro lado los finos.

El contenido de finos fue perceptible desde el punto de vista sensorial. Se puede visualizar en la Figura 2 la turbidez del aceite con contenido de finos en suspensión, mientras que el aceite obtenido luego de la etapa de centrifugación se encuentra límpido y brillante (Figura 3).

Figura 2: Aceite turbio de nuez pecán. *Tratamiento Starking 2,0 kg*.

Figura 3: **Aceite de nuez pecán sin presencia de finos en el seno del líquido. Se visualizan los finos sedimentados. *Tratamiento Starking 2,0 kg*.**

Desde el punto de vista analítico, se obtuvo que el contenido de finos en los aceites fue mayor en los paquetes de 2,0 kg; alcanzando el valor de 1,05 ± 0,16 %; mientras que no se observó diferencias significativas en el contenido de finos de los

aceites extraídos de los paquetes de 1,0 y 1,5 kg (Figura 4).

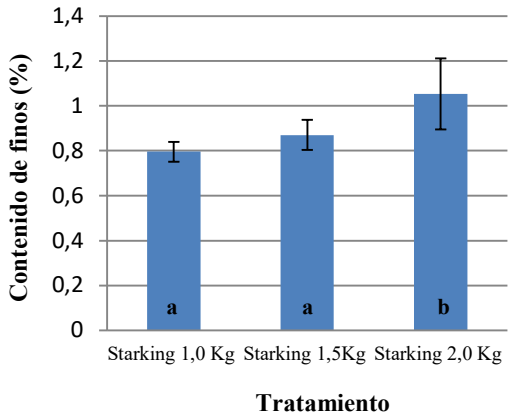


Figura 4: **Contenido de finos presentes en aceites de nuez pecán de la variedad Starking.**
Letras minúsculas distintas señala diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

Los contenidos de finos obtenidos en la presente investigación fueron inferiores a los publicados por Martínez *et al*. (2012), quienes obtuvieron contenido de finos en aceite en el rango de 5,7 – 16,8 % para nuez de castilla y de 2,6 – 28,6 % para almendras. En otros estudios de Martínez (2010) en aceite de nuez de castilla el contenido de finos estuvo comprendido entre 11,4 – 16,7 %. La diferencia entre estos autores y los resultados obtenidos en el presente estudio fue atribuido a que, los primeros trabajaron con prensa helicoidal, mientras que en esta investigación se utilizó una prensa hidráulica.
En la literatura se encontraron otros estudios en los que también la cantidad de sedimentos presentes en aceites de diferentes materias primas fueron superiores a los señalados para este estudio. Vargas-Lopez *et al*. (1999) obtuvieron sedimentos en el aceite de semillas de Crambe "*Crambe abyssinica*" comprendido entre 2,3 - 4,4 %; mientras que Singh *et al*. (2002) registraron para semillas de Cambré cocidas y crudas 0,9 -7,8 % y de 1,1 - 5,4 %, respectivamente.

Referido al contenido inicial de aceite, la cantidad contenida en los frutos de nuez pecán de variedad Starking fue 72,7 ± 0,4 g/100g en base seca. Este valor está dentro del rango encontrado por otros autores. Oro *et al*. (2008) evaluaron una mezcla de nuez pecán de las variedades Barton, Shoshoni, Shawnee, Choctaw y Cape Fear, y hallaron un valor de 69,4% de lípidos. Por su parte, Fernandes *et al*. (2017) reportaron contenidos de aceite entre 58 y 74 % para nueces pecán obtenidas en un local comercial de Brasil. Ros (2010) mencionó el valor de 72,0 % para nuez pecán en Estados Unidos. También Descalzo *et al.* (2021) reportaron un contenido de aceite de 77,5 ± 1,3 % para la variedad Stuart cultivada en el Delta del Paraná. Las variaciones entre el resultado obtenido y los publicados por los diferentes investigadores fueron atribuidos a que el contenido de aceite depende de la variedad de nuez, de la localidad y del año de producción (Shahidi y Miraliakbari, 2005).

Los ácidos grasos predominantes en el aceite fueron los ácidos insaturados: oleico (18:1) 49,5 %; linoleico (18:2) 38,9 % y linolénico (18:3) 1,7 %. Mientras que los ácidos grasos saturados presentes fueron palmítico (16:0) 6,7 % y esteárico (18:0) 2,7 %. El 0,5 % restante estuvo compuesto por los ácidos aráquidónico (C20:0), palmitoleico (16:1), margárico (C17:0), heptadecanoico (C17:1), y behénico (C22:0).

Estos valores coinsiden con los encontrados por Fernandes *et al*. (2017). Estos autores cuantificaron el perfil de ácidos grados de nuez pacán de Brasil, encontrando que el ácido graso predominante fue el ácido oleico (49,6-62,1 g/100 g aceite), seguido de ácido linoleico (27,2-37,71 g/100 g aceite), ácido palmítico (6,4-7,6 1 g/100 g aceite), ácido esteárico (2,2-2,81 g/100 g aceite), ácido linolénico (1,4-1,91 g/100 g aceite) y en menor proporción los ácidos mirístico y palmitoleico.

Otros autores han encontrado mayores proporciones de ácido oleico en nuez pecán argentina. Marchetti *et al*. (2017) indicaron 65,1 % mientras que Guidi *et al*. (2019) encontraron una proporción de 65,7 % de este ácido graso. Sin embargo, dichos autores no señalaron la variedad de nuez pecán utilizada. En un trabajo anterior Panozzo *et al.* (2018) encontraron que, en esta variedad, la menor proporción de ácido oleico se compensa con una mayor cantidad de ácido linoleico. Marchetti *et al*. (2017) y Guidi *et al*. (2019) indicaron 28,6 y 23,2 % respectivamente, para dicho ácido graso.

Como puede observarse este aceite de nuez pecán es valioso desde el punto de vista nutricional ya que contiene una elevada proporción de ácidos grasos omega 9, omega 6 y omega 3; siendo estos dos últimos, esenciales para el organismo humano y por lo tanto, deben ser aportados por la dieta (Atehortúa Osorno *et al*., 2017; Borges *et al*. 2017). Sin embargo, este elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados (90,1%) hace que estos aceites sean susceptibles de oxidación (Atanasov *et al*., 2018), proceso que se vería favorecido por la presencia de finos.

Con respecto al rendimiento del proceso de prensado, la cantidad de aceite extraído en el

tratamiento de 1,0 kg fue un 18 % más que en el tratamiento de 2,0 kg (Figura 5). Esta diferencia fue atribuida a que una menor cantidad de nuez posibilitó un mejor trabajo de la prensa hidráulica.

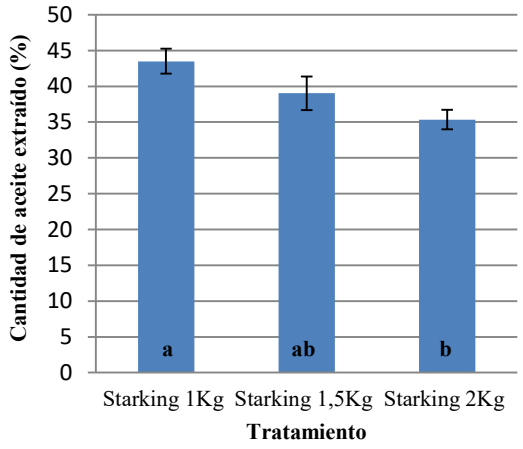


Figura 5: **Rendimiento de obtención de aceite de la etapa de prensado.**
Letras minúsculas distintas señala diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

Pardo *et al*., (2019), encontraron que los rendimientos de obtención de aceite con prensa hidráulica oscilaron entre 33 y 43 % para almendra, 46 y 55 % en el caso de la nuez de castilla y 26 a 31% para el pistacho. Estos investigadores, en los estudios realizados sobre la optimización de la extracción del aceite de frutos secos mediante esta prensa, evaluaron la influencia de la presión y del tiempo de extracción, considerando tres presiones de extracción (80 kgf/cm^2, 120 kgf/cm^2 y 160 kgf/cm^2) y tres tiempos de extracción (2 min, 3 min y 4 min, para la almendra; 1 min, 2 min y 3 min, para la nuez, y 10 min, 12 min y 15 min. La cantidad de materia prima de partida fue, en todos los casos, de 800 g (200 g por paquete). Los resultados de la presente investigación, serían semejantes a los obtenidos para almendra.

Se observa que, en los paquetes más pequeños (1 kg) se obtuvo un mayor rendimiento de aceite y menor proporción de finos en dichos aceites.

4. Conclusiones

De lo expuesto, se concluye que tanto el rendimiento de extracción de aceite de nuez pecán, como el contenido de finos presentes en los mismos, dependió de la cantidad de nuez pecán prensada; obteniéndose los mejores resultados para los paquetes conteniendo una menor cantidad de nuez en la prensa hidráulica.

En el aceite se observó una alta proporción de ácidos grasos insaturados, particularmente de ácido oleico (omega 9); seguido por el ácido linoleico (omega 6) y el ácido linolénico (omega 3); con un bajo contenido total ácidos grasos saturados. El contenido de ácidos grasos cumple con los requerimientos señalados por la FAO, por lo que podría atribuirse a este aceite de nuez pecan propiedades beneficiosas para la salud.
Por otra parte, si bien los contenidos de finos presentes en los aceites de nuez pecán fueron bajos, es recomendable en el proceso de obtención incorporar una etapa que contemple su eliminación, con el fin de mejorar el aspecto visual de los mismos. Esto posibilitaría mantener la calidad organoléptica de los aceites obtenidos.

5. Agradecimientos

Se agradece la financiación del proyecto INTA 2019-PD-E7-I153. También agradecemos a Miguel Ricobelli Y Delta Comex S.A., pertenecientes al Cluster de la Nuez Pecán por la donación y pelado de las nueces para los ensayos.

6. Referencias

AOAC (2005). Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*, 18th Ed. Horwitz, W.; Latimer, G.

Atanasov A.V. y otros 9 autores (2018). *Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effect,* in Food Science & Technology 71: 246-257 ISSN 0924-2244, https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.019.

Atehortúa Osorno, A.C., y otros 2 autores (2017) *Caracterización de diversas especies de peces como fuente de PUFAs y omega 3 según su perfil de ácidos grasos,* Perspect Nutr Humana. 19:93-108.

Borges, T.H. y otros 5 autores (2017) *Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile,* Food Chemistry, 215: 454–462

Descalzo A.M. y otros 6 autores, (2021). *Oxidative stability parameters and sensory properties of in-shell "Stuart" pecans [Carya illinoinensis (Wangenh.) K.Koch] stored at different temperatures under non-accelerated conditions,* Postharvest Biology and Technology 179:111591

Dorni, C. y otros 3 autores, (2018). *Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India*, Food Chemistry, 238:9-15, ISSN 0308-8146, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.072.

Fernandes, G.D. y otros 4 autores, (2017). *Chemical characterization of major and minor compounds of nut oils: almond, hazelnut, and pacán nut*, Jornal of Chemistry. https:// doi.org/10.1155/2017/2609549

Frusso, E. (2014). *Influencia del nitrógeno, fósforo y cinc sobre la composición química y rendimiento de la nuez pecán y su relación con la variabilidad de nutrientes en hoja*, Tesis doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires.

Frusso, E. (2020). *El cultivo de pecán en la Argentina,* Revista Argentina Forestal. Sep. https://www.argentinaforestal.com/2020/09/28/el-cultivo-de-pecan-en-la-argentina/

García-Pascual, P. y otros 3 autores, (2003) *Influence of storage conditions on the quality of shelled and roasted almonds*, Biosystems Engineering, 84: 201 . 209.

Grauke, L.J. y otros 3 autores, (2001). *In Abstracts of the 98th annual international conference of the American society for horticultural science* (p. 498). ASHS.

Guidi, S. y otros 3 autores, (2019). *Desarrollo de barra de nuez pecan con cereales,* en libro Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios. Agroindustria y Agregado de valor". Editor. Andrea Biolatto. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Heaton, E.K. y otros 3 autores, (1977). *Pacáns: Handling, Storage Processing and Utilization*, University of Georgia AES Research Bulletin 197.

Ixtaina, V. (2010). *Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia hispánica L.) obtenidos mediante distintos procesos. Aplicación en tecnología de alimentos*, Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Maestri, D. M. y otros 5 autores, (1998). *Seed composition of soybean cultivars evaluated* in different environmental regions, Journal of the Science of Food and Agriculture, 77: 494-498.

Marchetti, L. y otros 3 autores, (2018). *Characterization of pecan nut expeller cake and effect of storage on its microbiological and oxidative quality,* Grasas y Aceites, 68:226. https://doi.org/10.3989/gya.0667171

Martínez, M.L., Mattea, M. & Maestri, D.M. (2008). *Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil,* Journal of Food Engineering, 88:399-404.

Martinez, M. (2010). *Extracción y Caracterización de Aceite de Nuez (Juglans Regia L.): Influencia del Cultivar y de Factores Tecnológicos Sobre su Composición y Estabilidad Oxidativa*, Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Martinez, M. y otros 4 autores, (2012). *Aportes a la sustentabilidad de la cadena de valor de frutos secos: obtención de aceite y harina de nuez (Juglans regia L.) y almendra (Prunus amygdalus L),* Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible Vol Nº1.

O´Fallon, J.V. y otros 3 autores, (2007). *A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs*, Journal of Animal Science, 85:1511–1521

Oro, T. y otros 4 autores, (2008). *Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces Pecán [Carya illinoinensis (Wangenh.) C. Koch] acondicionadas en diferentes envases,* Grasas y Aceites 59:132–138. https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i2.501

Panozzo M. y otros 3 autores, (2018). *Composición de ácidos grasos de aceites de distintas variedades de nuez pecan [Caryaillinoinensis (Wangenh.) K. Koch] cultivadas en la provincia de Entre Ríos,* en libro "Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios". Agroindustria y Agregado de valor". Editor. Andrea Biolatto. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Pardo, J. y otros 6 autores, (2019). *Obtención y caracterización de aceites de frutos secos vírgenes,* en X Congreso Ibérico de Agroingeniería. doi: 10.26754/c_agroing.2019.com.3321

Rivera-Rangel, L.R. y otros 5 autores, (2018) *Comparison of Oil Content and Fatty Acids Profile of Western Schley, Wichita, and Native Pacán Nuts Cultured in Chihuahua, Mexico,* Journal of Lipids 2018:1-6

Ros E. (2010). *Health Benefits of Nut Consumption,* Nutrientes *2,* 7:652-682.

https://doi.org/10.3390/nu2070652

Rudolph, C.J. y otros 4 autores, (1992). *Genetic, environmental, and maturity effects on pacán kernel lipid, fatty-acid, tocopherol, and protein-composition,* Journal of Food Quality, 15 (4): 263–278.

Shahidi F. Miraliakbari H. (2005). *Tree Nut Oils,* en Shahidi F. (Ed). Bailey's Industrial Oil and Fat Products **3**, 6th Ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ.

Singh, K.K. y otros 3 autores (2002). *Influencia del contenido de humedad y la cocción en el prensado del tornillo de la semilla de crambe*, en J Amer Oil Chem Soc, 79:165-170 https://doi.org/10.1007/s11746-002-0452-3

Vargas-Lopez J.M. y otros 3 autores, (1999). *Processing of Crambe for Oil and Isolation of Erucic Acid,* Journal of the American Oil Chemist 's Society, 7 6, 801-809.

22TCA - Estabilidad física y bioaccesibilidad de ácidos grasos omega 3 en nanoemulsiones de aceite de chía estabilizadas con Tween 80 y saponina quillaja.

Physical stability and bioaccessibility of omega 3 fatty acids in chia oil nanoemulsions stabilized with Tween 80 and quillaja saponin.

Noelia Cittadini[1], Fernando Bellesi[1,2], Carolina Arzeni[1,2], Ana Pilosof[1,2].

1. ITAPROQ – Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, CABA.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Resumen

El objetivo es evaluar el reemplazo parcial de Tween 80 (T80) por saponina quillaja (SQ) en la estabilidad de nanoemulsiones de aceite chía durante el almacenamiento y en la bioaccesibilidad de los ácidos grasos omega 3 (ω3). Para ello, se realizó un diseño experimental a partir del cual se obtuvieron emulsiones O/W utilizando un homogeneizador de alta presión, que presentaron tamaños de gota entre 125,8 y 190,9 nm y fueron estables luego de 5 meses de almacenamiento. Para evaluar la bioaccesibilidad de los w3 encapsulados, las nanoemulsiones se sometieron a un proceso de digestión gastroduodenal in vitro, a partir del cual se cuantificaron los ácidos grasos liberados por la lipasa pancreática en la fase duodenal. Si bien la presencia de SQ condujo a una reducción en la liberación de w3, en todas las formulaciones la liberación de ácidos grasos superó el 50%. Si se deseara emplear estas nanoemulsiones para la fortificación de alimentos con w3, esta reducción en la bioaccesibilidad no implicaría mayor incorporación de T80 en el alimento. En conclusión, es factible reemplazar parcialmente el uso de T80 por SQ en nanoemulsiones de aceite de chía, conservando una muy buena estabilidad física y adecuada bioaccesibilidad de omega 3.

Palabras clave: nanoemulsiones, bioaccesibilidad, estabilidad.

Abstract

The objective is to evaluate the partial replacement of Tween 80 (T80) by quillaja saponin (SQ) in the stability of chia oil nanoemulsions during storage and in the bioaccessibility of omega 3 fatty acids (ω3). An experimental design was carried out in which O/W emulsions were obtained using a high pressure homogenizer. The emulsion obtained presented droplet sizes between 125.8 and 190.9 nm and were stable after 5 months of storage. To evaluate the bioaccessibility of the encapsulated ω3, the nanoemulsions were subjected to an *in vitro* gastroduodenal digestion process, where the fatty acids released by pancreatic lipase in the duodenal phase were quantified. Although the presence of SQ led to a reduction in the release of ω3, in all formulations the release of fatty acids exceeded 50%. If it were desired to use these nanoemulsions for the fortification of foods with w3, this reduction in the bioaccessibility would not imply greater incorporation of T80 in the food. In conclusion, it is feasible to partially replace the use of T80 by SQ in chia oil nanoemulsions, preserving very good physical stability and adequate omega 3 bioaccessibility.

Keywords: nanoemulsions, bioaccesibility, stability.

1. Introducción

En las últimas décadas ha habido un gran interés en la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados esenciales (tales como los omega 3 (ω-3)) dentro de alimentos, suplementos y productos farmacéuticos debido a los múltiples beneficios que estos aportan para la salud (disminución del riesgo cardiovascular, prevención de enfermedades del sistema nervioso y disminución de los síntomas de enfermedades inflamatorias crónicas (Kulczyński *et al*., 2019; Uribe *et al*., 2011)). Los efectos benéficos de los ω-3 de pescado son tradicionalmente quienes han recibido mucha atención, sin embargo, sus ácidos grasos son fácilmente oxidables formando hidroperóxidos y sus productos de degradación secundaria, que pueden ser dañinos para las células. La oxidación de los lípidos alimenticios también constituye un grave problema para los fabricantes de alimentos, dado que, si no se controla, da lugar al desarrollo de sabores extraños (Okuyama y Ikemoto, 1999). En contraste con el aceite de pescado, el aceite de chía, fuente vegetal de omega 3, no tiene ni produce olor a pescado, no aporta colesterol (puesto que es una especie vegetal) y posee una fuerte actividad antioxidante. Esta última deriva de la protección natural con la que la planta preserva sus ácidos grasos ω-3 (Hrnčič *et al.*, 2020). Sin embargo, la incorporación de lípidos bioactivos en alimentos, cuyo principal componente es el agua, presenta varios desafíos tecnológicos que incluyen la manera de vehiculizarlos en la fase acuosa y el aseguramiento de su liberación en el intestino delgado, donde finalmente serán absorbidos (bioaccesibilidad). Entre las alternativas que permiten la inclusión de lípidos en sistemas líquidos se encuentran el diseño de sistemas coloidales de liberación que incluyen las emulsiones, especialmente las nanoemulsiones que, debido a su pequeño tamaño, producen menores variaciones en el color o transparencia de algunos alimentos (Alzorqi *et al.*, 2016). A su vez, para asegurar que los lípidos incorporados en un alimento sean bioaccesibles, es importante tener en cuenta que las emulsiones diseñadas para tal fin, garanticen su liberación en el intestino delgado. Para tal fin, es importante considerar que la digestión de lípidos ocurre principalmente a nivel duodenal. Se trata de un proceso en el cual la lipasa pancreática tiene que adsorberse en la interfase aceite-agua de la emulsión para que tenga lugar la hidrólisis de los triglicéridos y se liberen ácidos grasos para ser absorbidos por el intestino (McClements, y Li, 2010). Diferentes artículos científicos, han demostrado que el emulsionante adsorbido en las gotas de aceite de la emulsión impacta en la actividad de la lipasa, por lo que la seleccionan racional de los emulsionantes constituye un punto crítico a considerar en el diseño de emulsiones funcionales (Pilosof, 2017). Si bien el Tween 80 (T80) es un emulsiónate ampliamente utilizado en la formulación de nanoemulsiones O/W debido a sus excelentes propiedades interfaciales, su origen sintético está siendo cuestionado debido a la tendencia actual de consumo que promueve y persigue productos de origen natural. Aunque su uso está aprobado y regulado por la FDA, algunos estudios indicaron que su consumo estaría relacionado a problemas inflamatorios y obesidad (Chassaing *et al.,* 2015). Por esta razón es importante buscar alternativas con el fin de reducir el uso de componentes sintéticos como el T80 y promover su sustitución por componentes naturales, para cumplir de esta forma con la creciente demanda por parte de los consumidores que buscan estilos de vida más saludables y consumo de alimentos naturales.

La saponina Quillaja (SQ) es un nuevo y prometedor tensioactivo natural que se obtiene por extracción acuosa o alcohólica de la corteza molida o madera entera de la Quillaja Saponaria Molina, un árbol originario de Chile (Kite *et al.,* 2004). Las saponinas se caracterizan por sus moléculas relativamente pequeñas, formadas por una aglicona (hidrófoba) y una o más cadenas de azúcar (hidrófila), que le confieren su naturaleza anfifílica, proporcionándole así sus propiedades tensioactivas (Yang *et al.,* 2013). El uso de saponinas como emulsionantes tiene varias ventajas ya que son naturales, biodegradables y sostenibles (McClements *et al*., 2017; Uzoigwe *et al*., 2015) y estabilizan las emulsiones de forma eficaz.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar cómo la utilización de SQ, emulsionante natural, como potencial reemplazo de T80, impacta en la estabilidad de nanoemulsiones y en la bioaccesibilidad de ácidos grasos omega 3 de aceite de chía.

2. Materiales y métodos

Para la obtención de las emulsiones se aplicó un diseño basado en una red de Doehlert (Doehlert, 1970) de 3 factores. Los factores estudiados fueron las concentraciones de los emulsionantes: saponina quillaja (SQ), Tween 80 (T80) y del cosolvente: glicerol (GLI) según se indica en la Tabla 1. Con cada una de las combinaciones se obtuvieron emulsiones O/W (10/90) utilizando como fase oleosa aceite de chía (Nutracéutica Sturla S.R.L., Argentina). La fase acuosa consistió en una solución de los emulsionantes y cosolvente preparada en buffer citrato pH 3. Cada fórmula se procesó en dos etapas: se obtuvo una emulsión primaria mezclando las fases por 3 min con ultraturrax de alta velocidad (Ika-Werke), seguido por 5 min de ultrasonido de alta intensidad (Sonics & Materials, Inc.) a 0,5 °C. En una segunda instancia la emulsión primaria se procesó con un

homogeneizador de alta presión (Panda Plus 2000, GEA) por dos pasos a 1000 bar obteniéndose de esta forma la nanoemulsión final.

Tabla 1. Composición de las fórmulas (G) obtenidas según red de Doehlert.

Fórmula	SQ (%p/p)	T80 (%p/p)	GLI (%p/p)
G1	3	3	20
G2	3	0,5	20
G3	3	2,375	35
G4	3	1,125	5
G5	3	2,375	5
G6	3	1,125	35
G7	5	2,375	25
G8	1	1,125	15
G9	1	2,375	15
G10	1	1,75	30
G11	5	1,125	25
G12	5	1,75	10
G13	3	1,75	20
G14	3	1,75	20
G15	3	1,75	20

Los diámetros promedio (Zav) y las curvas de distribución de tamaño de las gotas de aceite de las diferentes fórmulas se determinaron por dispersión dinámica de luz en un equipo analizador de partículas Nano-Zetasizer (Malvern Instrument). Las determinaciones del tamaño de partícula se realizaron sobre las emulsiones recién preparadas y sobre aquellas almacenadas a lo largo del tiempo (25 °C) a fin de evaluar la estabilidad física de cada una. La digestión gastroduodenal *in vitro* se realizó sobre cuatro nuevas formulaciones preparadas para validar el diseño experimental. La misma llevó a cabo a 37 ºC utilizando el método de titulación pH stat (Metrhom) según el protocolo reportado por Bellesi *et al.,* (2016). Se mezclaron las nanoemulsiones con fluido gástrico simulado (pH 2,5, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 3 mM, NaH_2PO_4 5 mM y KCl 22 mM) en presencia de concentraciones fisiológicas de pepsina y α-fosfatidilcolina. Después de una hora de incubación, se detuvo la proteólisis gástrica aumentando el pH a 7 (NaOH 0,5 M). La digestión continuó mediante la incorporación de fluido intestinal simulado (pH 7, K_2HPO_4 39 mM, NaCl 150 mM y $CaCl_2$ 30 mM) en presencia de sales biliares, lipasa pancreática y las proteasas tripsina y α-quimotripsina. Todos los agentes bioquímicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Durante la etapa duodenal (2 h), se controló el pH continuamente en un valor de 7 usando NaOH (0,5 M) para neutralizar los ácidos grasos liberados (AGL) por la lipasa. El % de AGL durante la etapa duodenal se calculó a partir del número de moles de NaOH requeridos para neutralizar los AGL utilizando la expresión informada por Zhang, *et al.,* (2015).
Los diseños experimentales empleados y los análisis estadísticos de los resultados fueron generados y ejecutados mediante el software STATGRAPHICS Centurion XVI.

3. Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra la variación del tamaño promedio de gota (Zav) obtenido para cada fórmula (Tabla 1) a lo largo del tiempo de almacenamiento a 25°C. Es importante destacar que en las formulaciones iníciales (formulaciones recién preparadas) los valores del Zav se encuentran entre 125,8 y 190,9 nm, es decir son inferiores a 200 nm, lo que confirma la obtención de nanoemulsiones (Mason *et al.*, 2006). Este resultado puede ser asociado a la capacidad emulsionante ya reportada para los emulsionantes empleados en combinación con la aplicación de altas presiones (McClements, 2015).

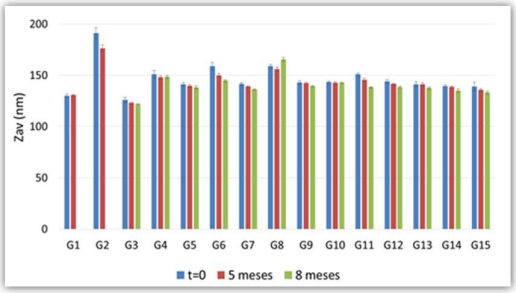


Figura 1. Tamaño de gota promedio (Zav) para cada fórmula (G) a lo largo del tiempo de almacenamiento.

En relación al almacenamiento, la Figura 1 refleja que, para todas las emulsiones, los diámetros se mantuvieron prácticamente constantes en el tiempo, observándose variaciones de apenas unos pocos nanómetros durante todo el período de análisis. Es importante señalar que ninguna de las emulsiones supera el límite de los 200 nm, por lo que mantienen su condición de nanoemulsiones y todas las características que ello implica.
En la Figura 2 se muestran, a modo de ejemplo, la distribución de tamaño de partícula en volumen obtenida para la fórmula G10 a distintos tiempos de almacenamiento a 25 °C. Puede observarse que, a lo largo del tiempo, la distribución no presentó variaciones apreciables y tampoco se evidenció la aparición de nuevas poblaciones de tamaños mayores, comportamiento que también se observó para el resto de las fórmulas. Como se observa en la Figura 1, para el caso de las fórmulas 1 y 2 sólo se pudo hacer un seguimiento de la evolución del tamaño de gota hasta los 5 meses de almacenamiento. Si bien la fórmula 1 presentó buena estabilidad hasta los 5 meses, no se pudo seguir su evolución a tiempos mayores debido a que no se contaba con la suficiente cantidad de muestra. Para el caso de la fórmula 2 (3% SQ; 0,5% T80;

20% GLI) se observó separación de fases a los 8 meses de almacenamiento, con lo cual se puede decir que fue la única fórmula que presentó inestabilidad en el tiempo. Este fenómeno puede deberse a que es la fórmula que contiene la menor concentración de T80 y por lo tanto presentó mayor tamaño inicial, en correlación con reportes que indican que las emulsiones que contienen altas concentraciones de T80 presentan una buena estabilidad física durante el almacenamiento (Arancibia *et al*., 2016; Raikos *et al.,* 2017).

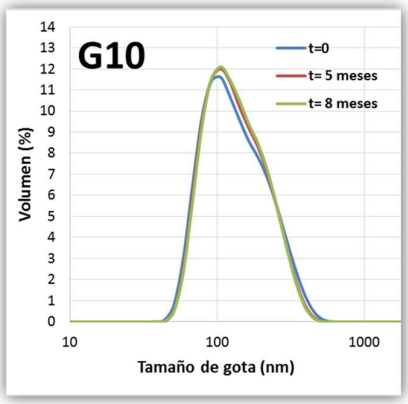


Figura 2. Distribución de tamaño de gota para la formulación G10 a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Con el objetivo de validar la predicción del valor del Zav arrojada por el diseño experimental utilizado, se procedió a realizar cuatro fórmulas (Fórmulas D) con distintas concentraciones de emulsionantes y cosolvente (Tabla 2), para luego poder comparar los resultados experimentales con los predichos por el método. Como se muestra en la Tabla 2 los resultados confirman que el modelo presenta una satisfactoria capacidad de predicción. Estas formulaciones son las que luego se utilizaron para realizar los estudios de bioaccesibilidad de omega 3 y evaluar el impacto de la presencia de SQ.

Tabla 2. Comparación de Zav entre resultados experimentales y predicción del modelo para distintas fórmulas (D).

Fórmula	% SQ	% T80	% GLI	Zav experimental	Zav predicho
D1	1	2	8	144,4± 10,0	142,2
D2	0.4	2	20	141,5± 19,5	142,4
D3	2	2	38	125,9± 12,0	130,9
D4	1	1,75	40	130,5± 14,0	141,8

En la Figura 3 se muestra la cinética de liberación de los ácidos grasos durante la etapa duodenal (2h) para cada una de las nanoemulsiones D. También se muestra como referencia una línea roja punteada que representa la liberación máxima de AG (%AGLmax) para una emulsión estabilizada únicamente con T80 al 5% (p/p). Para todos los casos se observó un perfil de lipólisis similar: una primera región, durante los primeros 10 minutos, donde el %AGL se incrementa rápidamente; seguida de una segunda región más extensa, a tiempos mayores, donde la curva alcanza un valor relativamente constante de pseudo-equilibrio. En trabajos previos se ha comprobado que, al trabajar con suficiente concentración de lipasa pancreática, su adsorción a la interfase O/W es casi inmediata a su incorporación al medio de reacción. A raíz de esto, el proceso de lipólisis comienza de manera inmediata una vez que se ha incorporado la lipasa pancreática, sin evidenciarse la existencia de un período de inducción (McClements y Li, 2010; Mun *et al*., 2007). La disminución en la velocidad de lipólisis en el tiempo puede asociarse con la acumulación de los productos de reacción (ácidos grasos y monoglicéridos) en la superficie de las gotas de aceite, que actúan como inhibidores de la lipasa, reduciendo su actividad (Pilosof, 2017).
La Figura 3 indica que las emulsiones estabilizadas con T80 (línea roja punteada) dan lugar a una mayor liberación de ácidos grasos que las emulsiones estabilizadas con una mezcla de T80 y SQ. El %AGLmax para el caso de las emulsiones con T80 ronda en un 68% (Naso, 2021) mientras que para las emulsiones obtenidas en presencia de SQ el máximo porcentaje de AGL se encuentra entre 50-56% es decir, la presencia de SQ implica una menor bioaccesibilidad de los omega 3.

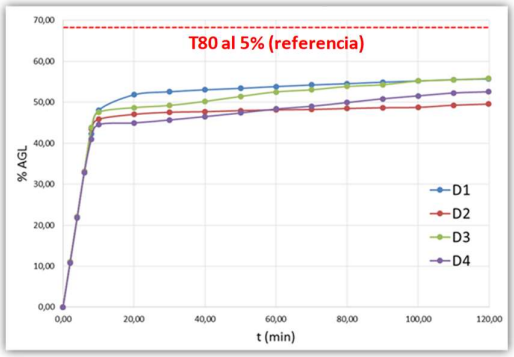


Figura 3. Liberación de los ácidos grasos (% AGL) en el tiempo durante la fase duodenal de la digestión de las nanoemulsiones D1, D2, D3 y D4. La línea roja punteada representa el máximo % de AGL para una emulsión estabilizada únicamente con T80 5% p/p.

Los menores grados de lipólisis obtenidos para las emulsiones estabilizadas con SQ, guardan relación

con reportes bibliográficos que reflejan el impacto de las saponinas sobre el metabolismo lipídico. Más específicamente, ha sido reportado que una de las actividades biológicas de las saponinas es su capacidad de disminuir la absorción intestinal de colesterol y se han propuesto varios mecanismos para explicar dicha actividad hipocolesterolémica. Estos mecanismos incluyen la capacidad de las saponinas para reducir la actividad de la lipasa pancreática, así como también su capacidad para interaccionar con las sales biliares, afectando su capacidad para formar micelas (Kregiel et al., 2017). Este último mecanismo, reduciría la capacidad de las sales biliares para remover los productos de la digestión, lo que promovería su acumulación interfacial afectando de forma directa en la actividad de la lipasa pancreática (Bellesi y Pilosof, 2021).
En base a los resultados obtenidos, si se desearan incorporar estas nanoemulsiones a un alimento, con la finalidad de fortificarlo, se debería agregar una mayor cantidad de las mismas para asegurar el mismo aporte efectivo de AG ω-3 que agregando una emulsión de T80 al 5%, dado que la bioaccesibilidad en las nanoemulsiones D es alrededor de un 20% menor que la obtenida para la emulsión de referencia. Podría pensarse que esto implica incorporar más cantidad total de T80, sin embargo los cálculos demuestran que se incorpora alrededor de un 50% menos de T80 cuando se fortifica el alimento usando las nanoemulsiones D, a pesar de tener que agregar más cantidad de emulsión para lograr el mismo aporte efectivo de AG ω-3.

4. Conclusiones

El parcial reemplazo de un emulsionante sintético como el T80 por uno natural como la SQ permitió la obtención de nanoemulsiones estables en el tiempo. Dado el pequeño tamaño de gota, la incorporación de las formulaciones en alimentos podría conducir a mínimos cambios en color o transparencia. Todas las formulaciones mostraron una bioaccesibilidad de ω-3 superior al 50%. Si bien la presencia de SQ conduce a una reducción en la bioaccesibilidad, la utilización de más formulación para fortificar un alimento no implica mayor incorporación de T80 en relación a una formulación de referencia estabilizada solo por T80.

5. Referencias

Alzorqi, I.; Ketabchi, M. R.; Sudheer, S.; Manickam, S. (2016). *Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β-D-glucan polysaccharides*. Ultrasonics Sonochemistry, 31, 71–84.

Arancibia, C.; Navarro, R.; Zúñiga, R.; Matiacevich, S. (2016). *Application of CMC as thickener on nanoemulsions based on olive oil: Physical properties and stability.* International Journal of Polymer Science, 1-10.

Bellesi, F.; Pilosof, A. (2021). *Potential implications of food proteins-bile salts interactions*. Food Hydrocolloids 118, 106766.

Bellesi, F.; Martinez, J.; Pizones V.; Pilosof A. (2016). *Comparative behavior of protein or polysaccharide stabilized emulsion under in vitro gastrointestinal conditions.* Food Hydrocolloids 52, 47-56.

Chassaing, B.; Koren, O.; Goodrich, J. K.; Poole, A. C.; Srinivasan, S.; Ley, R. E.; Gewirtz, A. T. (2015). *Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome*. Nature 519 (7541), 92–96.

Doehlert, D. H. (1970). *Uniform Shell Designs. Applied Statistics.* Journal of the Royal Statistical Society Series 19 (3), 231-239.

Hrnčič, M. K.; Ivanovski, M.; Cör, D.; Knez, Ž. (2020). *Chia Seeds (Salvia Hispánica L.): An overview-phytochemical profile, isolation methods, and application.* Molecules, 25 (1), 1–25.

Kite, G; Howes, M; Simmonds, M. (2004). *Metabolomic analysis of saponins in crude extracts of Quillaja saponaria by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 18(23), 2859–2870.

Kregiel, D.; Berlowska, J.; Witonska, I.; Antolak, H.; Proestos, C.; Babic, M.; Babic, L.; Zhang, B. (2017). *Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants*. Application and Characterization of Surfactants. University of Tabriz, Iran.

Kulczyński, B.; Kobus-Cisowska, J.; Taczanowski, M.; Kmiecik, D.; Gramza-Michałowska, A. (2019). *The chemical composition and nutritional value of chia seeds—current state of knowledge.* Nutrients 11 (6).

Mason, T.; Wilking, J.; Meleson, K.; Chang, C.; Graves, S. (2006). *Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties.* Journal of Physics Condensed Matter 18(41), 635–666.

McClements, D.J.; Bai, L.; Chung, C. (2017). *Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions.* Annual Review of Food Science and Technology 8, 205–236.

McClements, D. (2015). *Food Emulsions: Principles, practices, and techniques*. CRC Press (3).

McClements, D.J.; Li (2010). *Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion based systems.* Food and Function 1 (1), 32-59.

McClements, D.; Li, Y. (2010). *Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components.* Advances in Colloid and Interface Science 159(2), 213–228).

Mun, S.; Decker, E.; McClements, D. (2007). *Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase.* Food Research International, 40(6), 770–781.

Naso, J. N. (2021). *Estudio de las interacciones entre las sales biliares y diferentes emulsionantes: Impacto en los mecanismos de lipólisis y la potencial bioaccesibilidad de ácidos grasos omega 3.* Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Okuyama, H.; Ikemoto, A. (1999). *Needs to Modify the Fatty Acids Composition of Meat for Human Health.* Congress of the 45th ICOMST II, 638–640.

Pilosof A.M.R. (2017). *Potential impact of interfacial composition of proteins and polysaccharides stabilized emulsions on the modulation of lipolysis. The role of bile salts.* Food Hydrocolloids 68, 178-185.

Raikos, V.; Duthie, G.; Ranawana, V. (2017). *Comparing the efficiency of different food-grade emulsifiers to form and stabilise orange oil-in-water beverage emulsions: influence of emulsifier concentration and storage time*. International Journal of Food Science and Technology, 52(2), 348–358.

Uribe, J. A. R.; Perez, J. I. N.; Kauil, H. C.; Rubio, G. R.; Alcocer, C. G. (2011). *Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO2.* Journal of Supercritical Fluids, 56(2), 174–178.

Uzoigwe, C.; Burgess, J. G.; Ennis, C. J.; Rahman, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. Frontiers in Microbiology, 6(245), 1–6.

Yang, Y; Leser, M. E.; Sher, A. A.; McClements, D. J. (2013). *Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale ®).* Food Hydrocolloids 30(2), 589–596.

Zhang, R.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Decker, E.; McClements, D.J. (2015). *Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: In vitro digestion study.* Food Research International 75, 71-78.

23TCA - Optimización de la extracción del mucílago de chía asistida por ultrasonidos de alta intensidad

Optimization of chia mucilage extraction assisted by high intensity ultrasound

Karen Saporittis[1], Rocío Morales[1], Ana MR Pilosof[1], María J. Martinez[1].

1. CONICET - Universidad de Buenos Aires, Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Buenos Aires, Argentina.
E-mail:karensaporittis@di.fcen.uba.ar

Resumen

El objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de extracción del mucílago de las semillas de chía mediante el uso de extracción asistida por ultrasonidos (US), y evaluar el efecto de estas condiciones en la proporción de fase traslúcida (FT) y fase opaca (FO) y en la viscosidad del mucílago. De manera adicional, se realizó una caracterización inicial del mismo. El máximo rendimiento, ajustado por la matriz experimental, fue de 6,7 % y las condiciones requeridas para obtener dicho valor fue una temperatura de 65ºC, relación semilla:agua 1:20 y un tiempo de 210 minutos. El rendimiento fue mayor que el reportado por otros autores y a condiciones de tiempos y temperaturas de extracción más bajas, lo que podría atribuirse al uso de US que permitió extraer más eficientemente el mucílago de la semilla. Además, el diseño de Doehlert permitió demostrar que mediante la selección de las condiciones de extracción es posible controlar la relación FT/FO y la viscosidad del mucílago. En este trabajo se propone que las diferencias en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del mucílago de chía reportado en la literatura podría ser atribuido a la proporción de fases opaca y traslúcida obtenidas dependiendo del método de extracción utilizado.

Palabras clave: mucílago de chía; extracción asistida por ultrasonidos; rendimiento; relación fase translúcida/fase opaca, viscosidad.

Abstract

The optimization of the conditions to remove both fractions of mucilage from chia seeds to maximize the yield by using ultrasonic-assisted extraction (UAE), and the effect of these conditions on the opaque (OP) or translucent (TP) phases ratio and on the mucilage viscosity were evaluated. Additionally, an initial characterization of chia mucilage obtained was done. The maximum yield estimated by adjusting the experimental matrix was of 6,7 % and the conditions required to obtain this response was a temperature of approximately 65ºC, seed:water ratio of 1:20 and an extraction time of 210 minutes. This optimum extraction yield was higher than that reported by other authors, but with lower extraction time and temperature conditions. This higher yield was attributed to the use of UAE that allowed the mucilage to easily detach from the chia seeds. Additionally, Doehlert design allowed demonstrate that by mean of the selection of the extraction conditions is possible to control the OP/TP ratio and the viscosity of the mucilage. In the present work, it is proposed that the differences in physicochemical and technological properties of chia mucilage reported in the literature could be attributed to the proportion of the opaque and translucent phases obtained depending to the extraction methods used.

Keywords: chia mucilage, ultrasonic-assisted extraction; yield; opaque and translucent phases ratio, viscosity.

1. Introducción

El mucílago de chía se localiza en las estructuras celulares de las tres primeras capas de la cubierta seminal (Muñoz et al., 2012). Cuando las semillas de chía se sumergen en agua se forma sobre la capa exterior de las mismas una película de gel firme, el mucílago, que está fuertemente unido a las semillas (Lin et al., 1994). Salgado-Cruz et al. (2013) estudiaron la microestructura del mucílago de la semilla de chía y reportaron que se excreta de las células poligonales de la capa de la epidermis, estando compuesta principalmente por fibras de carbohidratos. Lin et al. (1994) reportaron que las unidades estructurales que componen el mucílago de la semilla de chía están constituidas por un tetrasacárido con una cadena principal compuesta por unidades de (1→4)-β-D-xilopiranosil - (1→4)-α-D-glucopiranosil - (1→4)-β-D-xilopiranosil con ramificaciones de 4-O-metil-α-D-ácido glucurónico en la posición O-2 de β-D-xilopiranosil de la cadena principal.

Sin embargo, el mucílago de chía no es un polisacárido homogéneo. Se informó la presencia de dos fracciones de mucílago de chía después de la extracción (Muñoz et al., 2012; Goh et al., 2016; Brütsch et al., 2019), una fracción soluble neutra (que tiene aproximadamente 35% p/p del polisacárido presente en el mucílago) y una fracción insoluble gelificada y cargada negativamente (65% p/p de polisacárido). La mayoría de los estudios informaron sólo sobre la fracción de polisacárido soluble debido a las dificultades para separar la fracción gelificada fuertemente unida a las semillas (Goh et al., 2016). El polisacárido completo (incluidas las fracciones soluble e insoluble) cuando se dispersó en agua mostró la presencia de partículas de microgel fibroso con un tamaño de partículas promedio de ~ 700 μm dispersas en la fase soluble (Goh et al., 2016).

El valor de potencial ζ para el mucílago ha sido reportado por pocos autores, variando desde -22 hasta -45 mV a pH 7 (Gheybi et al., 2021; Timilsena et al., 2016). Estos autores atribuyen la negatividad del potencial ζ a la presencia de ácidos urónicos. A su vez, estos resultados son semejantes a valores informados para otros tipos de gomas. Hesarinejad et al. (2015) declararon que el potencial ζ de la goma de semilla de *A. homolocarpum* es de -25 mV, Huang y Zhou (2014) informaron un valor de -20 mV para goma de durazno, Martin et al. (2017) indicaron un valor de -25 mV para el mucílago de *Pereskia aculeata* en agua y atribuyeron la carga superficial de este mucílago a la presencia de grupos carboxilo en la estructura del ácido galacturónico y en las cadenas laterales de aminoácidos.

El mucílago de chía tiene un gran potencial como espesante en la industria alimentaria por sus propiedades nutricionales (alto contenido en fibra) y tecnológicas (alta capacidad de retención de agua y viscosidad, propiedades emulsionantes) (García-Salcedo et al., 2018; Campos et al., 2016; Punia et al., 2019; Zettel et al., 2018). Sin embargo, su aplicación permanece restringida debido a la dificultad de lograr altos rendimientos de extracción debido a la fuerte adhesión de la capa de mucílago a la semilla y a valores variables de las propiedades funcionales según el procedimiento de extracción.

En la literatura se han reportado diferentes métodos de extracción del mucílago de semillas de chía, incluyendo varios pretratamientos, técnicas de agitación y diferentes relaciones semilla:agua, tiempos y temperaturas de remojo. Después de la hidratación de las semillas y la liberación del mucílago de chía, se han utilizado diferentes técnicas para separar las semillas de chía hidratadas y el mucílago, como por ejemplo la separación por centrifugación (Hussain et al., 2020), secado y liofilización (Campos et al., 2016; Orifici et al., 2018; Coorey et al., 2014), filtración industrial de alto vacío (Masuelli et al., 2018). Además, con el fin de optimizar las condiciones de extracción, se han utilizado algunos procesos más drásticos, como precipitación con etanol, ajuste de pH alcalino, urea, adición de sal, entre otros. Esto lleva a un rendimiento que varía de aproximadamente 5 a 7% (Muñoz et al., 2012; Lin et al., 1994, Goh et al., 2016; Campos et al., 2016; Punia et al., 2019), alcanzando incluso el 12,6% utilizando Soxhlet y métodos de extracción de fluidos supercríticos (Segura-Campos et al., 2014).

Además de los diferentes rendimientos reportados según las condiciones de extracción, también existen diferentes resultados en la literatura en cuanto a las propiedades fisicoquímicas del mucílago de chía. De hecho, se han reportado discrepancias en la capacidad de absorción de agua con valores desde 95,6 g/g (Punia et al., 2019) o 103,2 g/g (Segura-Campos et al., 2014) hasta 162,0 g/g (Fernandes et al., 2018) e incluso valores superiores como 266,55 g/g (Coorey et al., 2014). Por otro lado, muchos autores reportaron el efecto de las condiciones de extracción sobre la viscosidad del mucílago de chía, con resultados contradictorios. Hussain et al. (2020) reportaron un aumento en la viscosidad aparente del mucílago con el aumento de temperatura, contrario a lo

encontrado por Campos et al. (2016). También estos autores estudiaron el efecto de la relación semilla:agua sobre la viscosidad aparente y reportaron una mayor viscosidad de un mucílago extraído con una relación semilla:agua 1:10 en comparación con otros extraídos con una relación menor (1:30) (Hussain et al., 2020). Campos et al. (2016) no encontraron un efecto relevante de la relación semilla:agua sobre la viscosidad aparente del mucílago. Estos diferentes resultados se han atribuido principalmente al método de extracción; pero las razones de estas diferencias aún no están claras.

Un método que se está implementando en los últimos años para favorecer la obtención de diferentes compuestos es la extracción asistida con ultrasonidos (US) de alta intensidad (Chemat et al., 2017). Se ha empleado en la extracción de polisacáridos de las raíces de valeriana (Hromádkováet al., 2002), Salvia officinalis (Hromádkováet al., 1999), Piña coreana (Chen et al., 2007), Lima (Toma et al., 2001), Azufaifo Zyziphus (Li J wei et al., 2007), semillas de chía (Castejón et al., 2017), Hyptis suaveolens (Jiménez-Flores et al., 2005), mucílago de semillas de lino (Fabre et al., 2015), mutamba (Guazuma ulmifolia Lam.) (Pereira et al., 2019) y Arabidopsis (Zhao et al., 2017). Por este motivo, se plantea la hipótesis de que la extracción del mucílago de chía asistida por US aumentará el rendimiento respecto a una extracción sin este tratamiento.

A la luz de lo anterior, el primer objetivo del presente estudio fue optimizar las condiciones para extraer el mucílago de las semillas de chía mediante el uso de US. Además, se planteó evaluar el efecto de las condiciones de extracción en la proporción de fase traslúcida (FT) y fase opaca (FO) obtenidas en el mucílago extraído y en sus parámetros reológicos. Y finalmente, realizar una caracterización inicial del mismo.

2. Materiales y métodos

2.1. Optimización de la extracción del mucílago de chía

2.1.1. Extracción del mucílago

Las semillas de chía (*Salvia hispanica L.*) utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por productores locales (Salta, Argentina). Se seleccionó un diseño de red uniforme Doehlert para tres factores en 3, 5 y 7 niveles para la evaluación de las condiciones de extracción de mucílago. Las variables estudiadas fueron la relación semilla:agua, temperatura y tiempo de extracción. Las respuestas estudiadas fueron rendimiento en g de mucílago de chía/ 100 g de semilla seca, relación FT/FO y parámetros reológicos (viscosidad, K y n).

Para extraer el mucílago se mezcló la cantidad necesaria de semillas de chía con 10 mL de agua destilada para obtener proporciones semilla:agua (p/v) de 1:10, 1:15 y 1:20. La temperatura durante la extracción se mantuvo a 25, 35, 45, 55 y 65°C bajo agitación con un agitador magnético durante 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 min. Posteriormente, la mezcla se sometió a ultrasonidos durante 3 minutos en un equipo procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics VCX750 (Newton, CT, EE. UU.) con una potencia neta máxima de 750 W, a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud del 20%, controlando la temperatura usando una camisa termostatizada de glicerina. La mezcla moderadamente viscosa de semillas y agua se centrifugó a 9000 g durante 20 minutos a 20 ºC (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante constaba de dos capas (ver **Figura 1**), la fase inferior era más viscosa y opaca y la fase superior más translúcida. Ambas se separaron del pellet de semillas y se mezclaron para posteriormente ser secadas por liofilización.

Para el diseño experimental, los valores reales de las variables independientes (x) se codificaron con base en una funcionalidad lineal entre los valores codificados (z) y reales (x) de acuerdo con la **Ecuación (1)**:

$$X = z.\ \Delta x / \Delta z + X_0 \qquad \textbf{(1)}$$

donde x es el valor real de la variable independiente; z es el valor codificado de la variable independiente dada por la matriz experimental (Doehlert, 1970); x0 es el valor real del punto central, y Δx y Δz son la diferencia entre los valores más alto y más bajo de los números reales y codificados, respectivamente. Los valores de xyz se muestran en la **Tabla 1**.

La red de Doehlert (**Tabla 2**) y las respuestas experimentales se analizaron utilizando el software Statgraphics 16.1.03 para realizar el análisis estadístico de las respuestas, desarrollar múltiples modelos de regresión a partir de los datos experimentales y obtener gráficos de superficie de respuesta para predecir las condiciones óptimas del proceso para maximizar el volumen de cada fase y el rendimiento de mucílago de chía. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo cuadrático completo (**Ecuación (2)**):

$$Y = b_0 + b_1x^1 + b_2x^2 + b_3x^3 + b_4x_1^2 + b_5x_2^2 + b_6x_3^2 + b_7\,x_1\,x_2 + b_8\,x_1\,x_3 + b_9\,x_2\,x_3 \quad \textbf{(2)}$$

donde Y, la variable dependiente, es la respuesta predicha (rendimiento de extracción, FT/FO y viscosidad), b son los coeficientes de regresión dados por el modelo, siendo b0 el término constante, b1, b2 y b3 los efectos lineales, b4, b5 y b6 los efectos cuadráticos, y b7, b8 y b9 los efectos de interacción. x1, x2 y x3 representan los niveles codificados de las variables independientes (proporción semilla:agua, temperatura y tiempo, respectivamente). Se realizó un análisis de varianza para evaluar las variables independientes que se encontraron significativas en P <0,05, y así determinar cuál de las variables del proceso tuvo efectos significativos en la respuesta. Solo se seleccionaron términos con coeficientes significativos para construir los modelos.

2.1.2. Determinación de la relación FT/FO

Las fracciones opacas y translúcidas observadas en la **Figura 1** después de la centrifugación, se recuperaron y se midieron sus respectivos volúmenes con el fin de determinar la relación FT/FO correspondiente en cada uno de los experimentos.

2.1.3. Determinación del rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción del mucílago se determinó mediante el peso seco del mucilago crudo relativo al peso de semillas secas. (Muñoz et al., 2012; Lin et al., 1994, Goh et al., 2016; Campos et al., 2016; Punia et al., 2019).

2.1.4. Determinación de parámetros reológicos

Se determinaron las curvas de flujo en un reómetro oscilatorio dinámico Modular Compact Rheometer (MCR 302, Anton Paar) con esfuerzo de corte controlado. Se utilizó un sistema de cono-plato con un ángulo de 2° (CP40-2). La temperatura fue controlada a 25°C mediante un sistema Peltier y un baño termostatizado. Se programó un aumento de la velocidad del rotor de 0,1 a 300 s-1. Se informó la viscosidad aparente (ηap) obtenida a partir de la relación de Shear Stress/Shear Rate a 10,3 s-1 y también los parámetros n y k obtenidos a partir del ajuste de las curvas de flujo con la ley de la potencia. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

2.2. Caracterización del mucílago de chía

2.2.1. Determinación de tamaño de partícula

El tamaño de partícula del mucilago de chía (solución 0,5 % p/p) se determinó por dispersión de luz estática utilizando un Mastersizer 2000 provisto de un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido). El tamaño de partícula se informó como el diámetro medio de la superficie del volumen o el diámetro de Sauter (D_{32}).

2.2.2. Mediciones de potencial ζ

Las mediciones de potencial ζ fueron realizadas por dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo Zetasizer Nano-Zs, (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) evaluando la movilidad electroforética de las partículas. Se realizó la curva de potencial zeta de soluciones de mucilago de chía (0,01 % p/p) a diferentes pH (1,3; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7 y 8). El pH se ajustó añadiendo HCl 0,01/0,1 M o NaOH 0,01 M. Los valores informados son el promedio y la desviación estándar de dos mediciones.

2.2.3. Determinación de la capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua se evaluó utilizando un aparato modificado de Baumann en el cual se puede determinar el volumen de agua absorbido por la muestra (10 mg), que es colocada sobre un papel de filtro en el otro extremo del aparato en función del tiempo. Se informó la capacidad de absorción de agua a los 200 minutos como miligramos de agua/10 miligramos de muestra.

2.3. Análisis estadístico

Para la comparación de medias de los resultados obtenidos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) (P < 0,05), utilizando el programa estadístico Statgraphic 16.1.03.

Tabla 1. Valores reales y codificados (entre paréntesis) de las variables estudiadas.

Variable	Valor real y codificado
Relación semilla:agua	1/20 (-0.816); 1/15 (0); 1/10 (0.816)
Temperatura (°C)	25 (-1); 35 (-0.5); 45 (0); 55 (0.5); 65 (1)
Tiempo (min)	30(-0.866); 60 (-0.577); 90 (-0.289); 120

(0); 150 (0.289);180 (0.577); 210 (866)

Tabla 3. Matriz experimental de la extracción del mucílago de chía.

Experimento	Relación semilla:agua	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	1:15	65	120
2	1:15	25	120
3	1:15	55	210
4	1:15	35	30
5	1:15	55	30
6	1:15	35	210
7	1:10	55	150
8	1:20	35	90
9	1:20	55	90
10	1:20	45	180
11	1:10	35	150
12	1:10	45	60
13	1:15	45	120
14	1:15	45	120
15	1:15	45	120

3. Resultados y Discusión

3.1. Optimización de la extracción del mucílago de chía

3.1.1. Extracción del mucílago de chía

Después de la centrifugación, último paso del proceso de extracción, se observaron dos fases en las semillas de chía (**Figura 1 – a,b,c**): una fase inferior opaca y más viscosa y, por otro lado, una fase superior más translúcida y menos viscosa. Ambas fracciones también fueron encontradas por otros autores sin la aplicación de ultrasonido (Muñoz et al., 2012; Goh et al., 2016; Brütsch et al., 2019); sin embargo, han resaltado las dificultades para separar la fracción de mucílago, fuertemente adherida a las semillas, por métodos convencionales y/o más drásticos. Por el contrario, en el presente trabajo se observó que el pellet de semillas era compacto con muy poco mucílago adherido a la superficie (comparando con una extracción sin ultrasonido como control (**Figura 1 g**)). Esto puede atribuirse al uso de extracciones asistidas por ultrasonidos, las cuales se han aplicado con éxito para obtener polisacáridos de otras semillas (Zhao et al., 2017), observando que este procedimiento mejora eficientemente la separación física del mucílago adherido a la semilla.

3.1.2. Determinación de la relación FT/FO

Después de la centrifugación, se separaron ambas fases para medir sus respectivos volúmenes, con el fin de calcular la relación FT/FO. Según la relación semilla:agua, se observaron diferencias en cuanto al color de la fase opaca, de tonalidad blanca a parduzca al cambiar la relación semilla:agua de 1:20 a 1:10 respectivamente (**Figura1 – d,e,f**), mientras que no se observaron cambios en las fases traslúcidas.

Las relaciones FT/FO se muestran en la **Figura 2**. En la misma, se puede ver una clara tendencia de agrupación en función de la relación semilla:agua. Los experimentos 8, 9 y 10 (barra con líneas onduladas) pertenecientes a la relación 1:20 presentaron una relación FT/FO significativamente mayor al resto debido a la mayor proporción de la fase traslúcida y además mostraron diferencias significativas entre ellos, lo que puede ser atribuido a las diferentes combinaciones temperatura/tiempo de extracción. Los experimentos 7, 11 y 12 (barra negra con puntos blancos), pertenecientes a la relación 1:10, presentaron una relación FT/FO significativamente menor al resto, debido a la menor proporción de fase traslúcida y una proporción de fase opaca más alta, pero no se observaron diferencias entre ellos. Por último, los experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14 y 15 (barra con líneas diagonales), correspondientes a la relación 1:15, mantuvieron valores de relación FT/FO intermedios, sin mostrar grandes diferencias entre ellos.

Estos resultados indican que las condiciones de extracción, sobre todo la relación semilla:agua determinarán qué tipo de fase será extraída mayoritariamente en el volumen de extracción final, lo que podría tener influencia sobre las propiedades reológicas del mucílago.

De hecho, a partir del análisis de la red de Doehlert se observó que el término lineal y el término cuadrático de la variable relación semilla:agua fueron los únicos términos significativos para esta respuesta. Por otro lado, del análisis de la red de Doehlert se obtuvieron las superficies de respuesta para la relación FT/FO graficadas en la **Figura 3**. En dicha figura se muestra la relación de fases FT/FO, para una relación de semilla:agua de 1:20 (a) 1:15 (b) y 1:10 (c). Se observó que para la relación 1:20 (**Figura 3a**) la relación FT/FO máxima se obtuvo en condiciones de baja temperatura (25 ºC) y cortos tiempos (30 min),

dicha relación de fases no mostró una variación muy pronunciada con los parámetros evaluados. Un comportamiento similar se observó con la relación 1:15 (**Figura 3b**) con relación FT/FO inferiores, con poca variación respecto a los parámetros evaluados. Por último, cuando la relación semilla:agua fue de 1:10 (**Figura 3c)**, la FT/FO mostró un valor máximo a altos tiempos (210 min) y altas temperaturas (65 ºC); sin embargo, los valores obtenidos son los más bajos de las tres relaciones semilla:agua estudiados, indicando que en esta condición de relación semilla:agua se pudo obtener la fracción máxima de FO.

Adicionalmente, de la optimización de los resultados de la red para maximizar la relación FT/FO, se obtuvo que el valor óptimo fue de 4,85 para las condiciones: 1:20, 26,8 ºC y 30 minutos. Y, por otro lado, para minimizar la relación FT/FO se obtuvo que el valor óptimo fue de 0,15 para las condiciones: 1:10, 35 ºC y 30 minutos. Estos resultados permiten concluir que a menor relación semilla:agua (1:20) más FT es extraída y en contraposición, cuando mayor es la relación semilla:agua (1:10) se logra más extracción de FO.

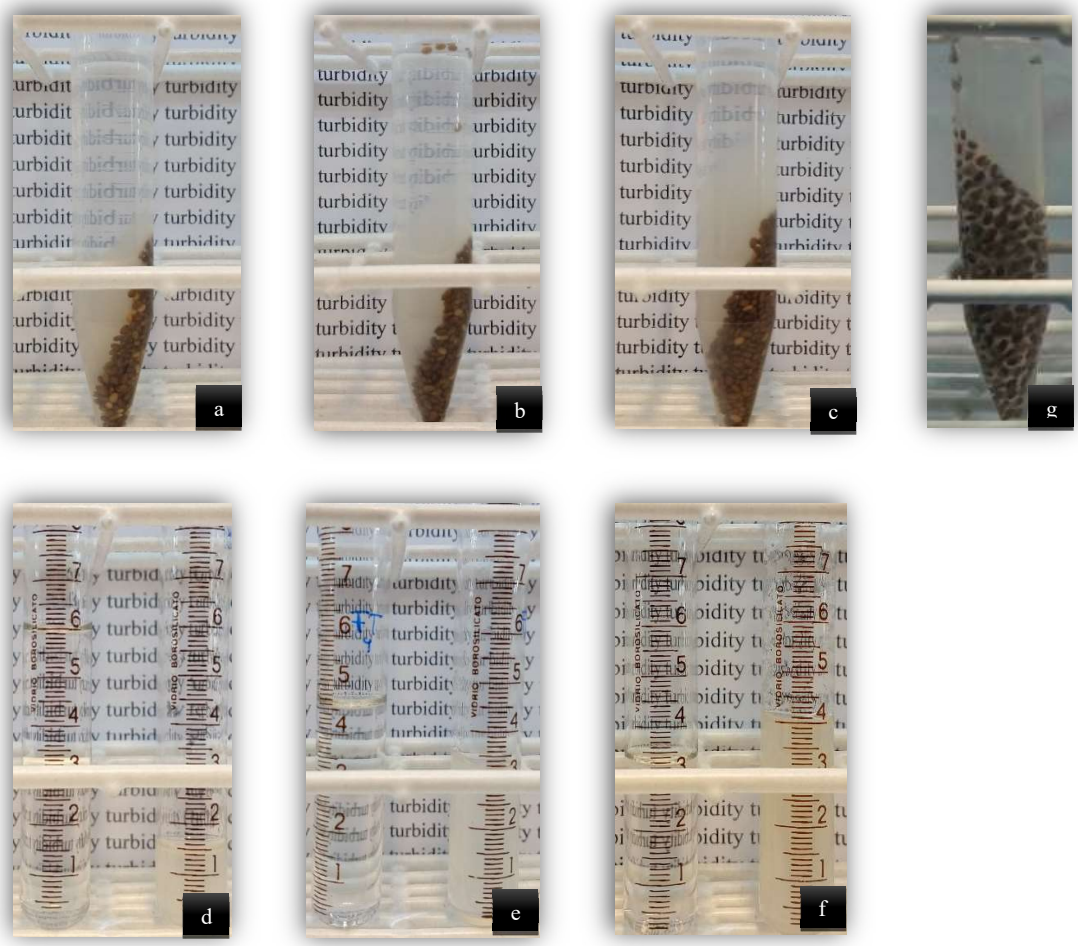


Figura 6. Volúmenes de fase traslúcida y fase opaca. a y d: experimento 9 (1:20; 55°C; 90 min), b y e: experimento 4 (1:15; 35°C; 30 min), c y f: experimento 12 (1:10; 45°C; 60 min) y g: experimento sin ultrasonido (control).

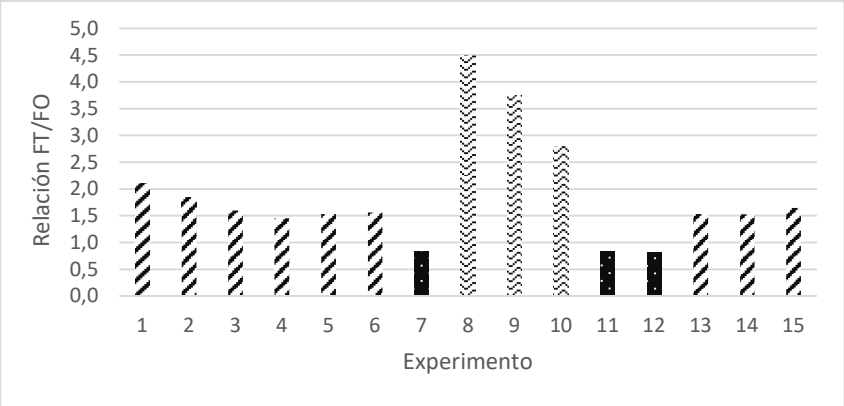


Figura 7. Relación FT/FO para cada uno de los experimentos de la red de Doehlert.

3.1.3. Determinación del rendimiento de extracción

Para visualizar los efectos combinados del diseño de las tres variables (tiempo, temperatura y relación semilla:agua) sobre la respuesta (rendimiento), se generó una gráfica de superficie de respuesta (**Figura 4**). Esta figura muestra el rendimiento (%) a un valor de relación semilla:agua fija en función de la temperatura y el tiempo. En la **Figura 4a**, se observó que a tiempos cortos de extracción (30 min) el rendimiento era prácticamente independiente de la temperatura, mientras que a tiempos de extracción largos (210 min) el rendimiento presentó una fuerte dependencia con la temperatura, es decir, un aumento de 25 a 65°C en la temperatura de extracción aumentó el rendimiento notablemente. El mismo patrón se puede ver en la **Figura 4b**.

El mayor rendimiento de extracción del mucílago fue de 6,7% y se obtuvo en una relación semilla:agua cercana a 1:20 a 65°C y 210 min. Este rendimiento de extracción óptimo fue superior al informado por otros autores: 1,2%; 5,6% y 5,09% (Goh et al., 2016; Timilsena et al., 2016; Campos et al., 2016) y similar al obtenido por Muñoz et al. (2012). Sin embargo, este último autor utilizó mayor proporción de agua en la condición de extracción (1:40) y mayor temperatura (80°C). En efecto, en las tres relaciones semillas:agua evaluadas en nuestro trabajo se obtuvieron rendimientos relativamente altos con condiciones de extracción moderadas respecto a los otros trabajos mencionados (Muñoz et al., 2012; Campos et al., 2016; Hussain et al., 2020; Orifici et al., 2018). Los tiempos y temperaturas de extracción más bajos podrían atribuirse al uso de ultrasonido de alta intensidad (Chemat et al., 2017) que permitió extraer de manera más eficiente el mucílago de la semilla de chía. Con el objetivo de verificar el efecto del uso de ultrasonidos para mejorar la extracción, luego de conocer las condiciones para optimizar el rendimiento, se realizó la extracción en dichas condiciones (1:20 a 65°C y 210 min) pero sin ultrasonidos y se obtuvo un rendimiento significativamente inferior (2,62%). Además del valor óptimo obtenido en el presente trabajo, es importante destacar que se puede lograr un rendimiento menor pero cercano a éste con cortos tiempos de extracción y bajas temperaturas, pero con una relación semilla:agua 1:10 (**Figura 4c**), lo que significa una condición con una cantidad de agua significativamente menor a la reportada en la literatura, facilitando el secado posterior.

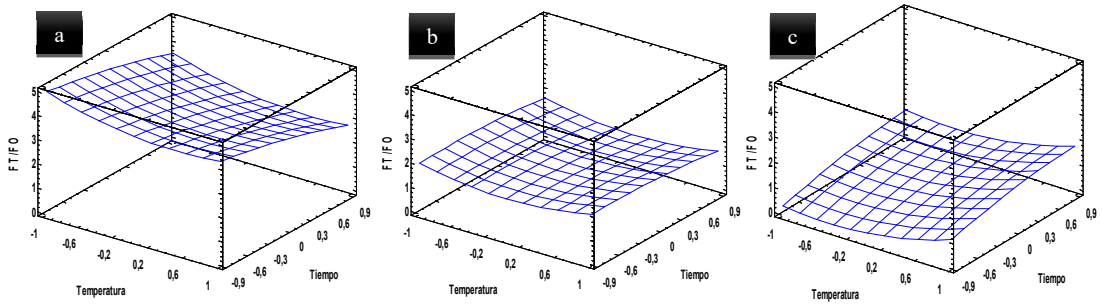


Figura 8. Superficie de respuesta estimada para la relación FT/FO a una relación de semilla:agua fija. a: 1:20 (-0.816), b: 1:15 (0) y c: 1:10 (0.816).

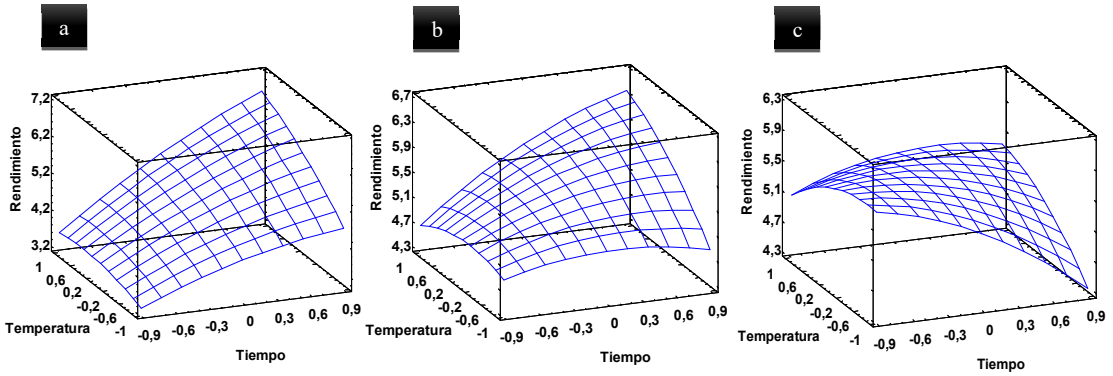


Figura 9. Superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción a una relación de semilla:agua fija. a: 1:20 (-0.816), b: 1:15 (0) y c: 1:10 (0.816).

3.1.4. Determinación de parámetros reológicos

Se determinaron las curvas de flujo de los mucílagos extraídos en los 15 puntos de la red y se observó, como en el caso de la relación de volúmenes, una clara agrupación de las curvas en función de la relación semilla:agua. En la **Figura 5** se muestran las curvas de flujo de tres mucílagos extraídos mediante los experimentos 4, 9 y 12, como ejemplo de cada una de las relaciones semilla:agua evaluadas. En dicha figura se puede observar que el mucílago de chía es un fluido pseudoplástico que presenta un esfuerzo mínimo de corte (a menor relación FT/FO mayor τ_0) y además presenta tixotropía, ya que se evidencia una histéresis entre la rama ascendente y descendente de las curvas de flujo (resultados no mostrados). Debido a esto y para poder realizar el ajuste correspondiente, se rompió la tixotropía realizando tres ciclos de medición en el reómetro.

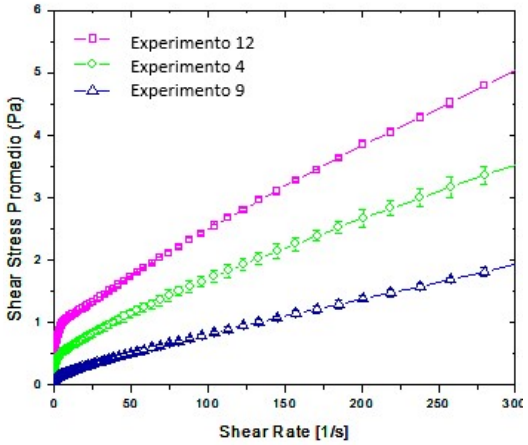


Figura 10. Curvas de flujo del mucílago de chía extraído mediante experimentos 4, 9 y 12.

Utilizando la última curva de flujo obtenida, una vez generada la ruptura de la tixotropía, se realizó el ajuste con La ley de la potencia. A partir del mismo, se obtuvieron la constante de proporcionalidad K y el índice de pseudoplasticidad n (**Tabla 3**). De la optimización de estos resultados para maximizar K, se obtuvo que el valor óptimo fue de 0,62 para una relación semilla:agua 1:10, 25,2 ºC y 210 minutos. Respecto a los valores de n, no se encontraron variaciones significativas entre las muestras.

La viscosidad aparente también fue medida sobre la última curva de flujo, a partir de la relación de Shear Stress/Shear Rate a 10,3 s-1. Dichos valores se observan en la **Tabla 3**. El valor óptimo resultó de 0,20 Pa/s para prácticamente las mismas condiciones que en la constante de proporcionalidad: 1:10, 26,1ºC y 210 minutos.

Tabla 3. K, n y η_{ap} para cada uno de los experimentos de la red de Doehlert.

Exp.	K	n	η_{ap} (Pa/s)
1	0,138 ± 0,025^{cd}	0,587 ± 0,018^{def}	0,061 ± 0,009^{d}
2	0,107 ± 0,036^{bc}	0,594 ± 0,066^{def}	0,048 ± 0,007^{bcd}
3	0,139 ± 0,024^{cd}	0,551 ± 0,005^{cd}	0,056 ± 0,009^{cd}
4	0,121 ± 0,011^{bc}	0,596 ± 0,008^{def}	0,056 ± 0,004^{cd}
5	0,060 ± 0,003^{ab}	0,653 ± 0,006^{efg}	0,032 ± 0,001^{ab}
6	0,267 ± 0,015^{e}	0,463 ± 0,009^{b}	0,087 ± 0,007^{f}
7	0,271 ± 0,075^{e}	0,526 ± 0,013^{bcd}	0,103 ± 0,026^{f}
8	0,035 ± 0,005^{a}	0,708 ± 0,020^{gh}	0,021 ± 0,002^{a}
9	0,025 ± 0,003^{a}	0,762 ± 0,017^{h}	0,017 ± 0,001^{a}
10	0,081 ± 0,012^{abc}	0,597 ± 0,027^{def}	0,037 ± 0,003^{abc}
11	0,497 ± 0,073^{f}	0,476 ± 0,012^{bc}	0,165 ± 0,018^{g}
12	0,189 ± 0,004^{d}	0,575 ± 0,006^{de}	0,083 ± 0,001^{ef}
13	0,055 ± 0,004^{ab}	0,660 ± 0,004^{fg}	0,030 ± 0,002^{ab}
14	0,136 ± 0,006^{cd}	0,564 ± 0,005^{d}	0,058 ± 0,002^{d}
15	0,272 ± 0,017^{e}	0,367 ± 0,117^{a}	0,065 ± 0,008^{de}

Letras minúsculas diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Los mucílagos extraídos mediante los experimentos 8 y 9 (relación semilla:agua 1:20) mostraron valores de viscosidad aparente significativamente menores que el resto, lo que podría explicarse por la mayor proporción de fase translúcida (menos

viscosa) obtenida mediante estas extracciones (**Figura 2**). El mucílago extraído mediante el experimento 10 (también con relación semilla:agua 1:20) mostró una baja viscosidad pero más cercana a los valores de los mucílagos extraídos con la relación semilla:agua 1:15, quizás debido al mayor tiempo de extracción del experimento 10 (180 minutos) que parece compensar el efecto de la relación semilla:agua. Por otro lado, el mucílago extraído mediante el experimento 5 (semilla:agua 1:15) dio un valor similar a los obtenidos con la relación 1:20, lo que podría atribuirse al menor tiempo de extracción utilizado, y a su vez también es similar a otros del grupo de los extraídos con la relación semilla:agua 1:15, que en general presentaron valores de viscosidad aparente intermedia.

Por último, los mucílagos extraídos mediante los experimentos 7, 11 y 12 (relación semilla:agua 1:10) presentaron valores de viscosidad aparente significativamente mayores que el resto, lo que también se vincula a los resultados de relación FT/FO en los cuales estos mucílagos presentaron valores significativamente menores de dicha relación, indicando una mayor proporción de fase opaca (fase más viscosa) en relación con el resto de los experimentos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hussain et al. (2020), quienes encontraron una mayor viscosidad aparente en los mucílagos extraídos con una relación semilla:agua 1:10 en comparación con otros extraídos con una relación menor (1:30). De hecho, a partir de la optimización de los resultados de la red para maximizar la viscosidad, se obtuvo que el valor óptimo fue de 0,20 para una relación semilla:agua 1:10, en la cual a su vez se logró la menor relación FT/FO (mayor proporción de FO). Un valor similar a los mucílagos 7, 11 y 12 fue observado para el mucílago 6 (relación semilla:agua 1:15), lo que podría atribuirse al mayor tiempo de extracción utilizado en ese caso (210 minutos) que, como en el caso del experimento 10, compensaría el efecto de la menor relación semilla:agua. En general, estos resultados indican que el factor que más influencia la viscosidad aparente es la relación semilla:agua, mostrando una relación directa con la proporción de fases translúcida/opaca presentes en el mucílago, lo cual ya se demostró que dependía principalmente de dicha variable de extracción (relación semilla:agua) (**Figura 2**). De hecho, a partir del análisis de la red de Doehlert se observó que las variables que presentaron efecto significativo tanto sobre la viscosidad como para la constante K fue la relación semilla:agua (similar a lo observado sobre el parámetro FT/FO). Esto podría explicar las diferencias en las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas del mucílago de chía reportadas en la literatura obtenido mediante diferentes condiciones de extracción, lo que implicaría diferentes proporciones de fases opacas y traslúcidas, y por lo tanto, diferentes viscosidades.

3.1.5. Ajuste de los modelos

Se evaluó el efecto de las variables independientes temperatura, relación semilla:agua y tiempo sobre la relación FT/FO, el rendimiento, la viscosidad y K. Se aplicó un análisis de regresión múltiple de los datos experimentales y se obtuvieron los coeficientes de regresión estimados para el efecto lineal, de interacción y cuadrático de las variables independientes. Las ecuaciones reducidas del análisis fueron las siguientes (**Ecuación 3**, **4, 5 y 6**):

$$\boldsymbol{FT/FO} = 1{,}56667 - 1{,}74626 * \textit{Relación semilla: agua} + 0{,}970873 * \textit{Relación semilla: agua}\text{^}2 \quad \textbf{(3)}$$

$$\textbf{Rendimiento} = 5{,}61333 + 0{,}498701 * \textit{Tiempo} \quad \textbf{(4)}$$

$$\textbf{Viscosidad} = 0{,}051 + 0{,}0563636 * \textit{Relación semilla: agua} \quad \textbf{(5)}$$

$$\textbf{K} = 0{,}154333 + 0{,}166632 * \textit{Relación semilla: agua} \quad \textbf{(6)}$$

Se obtuvieron coeficientes R^2 de 0,95, 0,85, 0,87 y 0,80 para FT/FO, rendimiento, viscosidad y K respectivamente, lo que significa que los modelos fueron capaces de explicar >80% de las respuestas observadas.

3.1.6. Validación de la red de Doehlert

Se realizó la validación de la red para el punto óptimo de rendimiento (1:20 a 65°C y 210 min) y para un punto intermedio (1:15 a 40°C y 75 min). En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos de rendimiento y de relación FT/FO según lo predicho por la red y lo validado experimentalmente, y se pudo observar que la validación fue correcta obteniendo valores muy similares a los esperados según la ecuación definida por la red.

Tabla 4. Validación de la red de Doehlert

	Rendimiento (%)		Relación FT/FO	
	Red	Experimental	Red	Experimental
Punto óptimo	6,70	6,98	2,82	2,91
Punto intermedio	5,38	5,32	1,63	1,64

3.2. Caracterización del mucílago de chía

3.2.1. Determinación de tamaño de partícula

Luego de haber optimizado las condiciones de extracción se seleccionaron mucílagos obtenidos mediante diferentes condiciones de extracción (con diferentes proporciones FT/FO) para evaluar el tamaño de partícula de estos. Los tamaños de partícula fueron semejantes entre las distintas muestras, obteniendo un promedio de 0,26 µm. Conforme a esto y comparando con otras gomas, se puede decir que el tamaño de partícula del mucílago de chía es similar al de la goma arábiga (0,16 a 0,29 µm) e inferior al de *Dioscorea opposita* (0,54 a 0,86 µm) y al mucílago de *Ornithogalum cuspidatum* (0,97 µm) (Ma et al, 2018; Gheybi et al., 2021).

3.2.2. Mediciones de potencial ζ

Los datos del potencial ζ de la solución de mucílago de chía en función del pH se presentan en la **Figura 6**. El potencial ζ se vio afectado por el pH debido al diferente grado de ionización del grupo carboxilo con acidez ambiental. De esta manera, se puede decir que el mucílago mostró una fuerte característica aniónica a pH alcalino, obteniendo un valor -28,7 ± 0,9 mV a pH 8. Sin embargo, dicha característica se redujo gradualmente con la disminución del pH y se convirtió en cero a pH 1,8 aproximadamente, coincidiendo con lo reportado por Timilsena et al (2016). Según estos autores, la característica aniónica del mucílago frente al rango de pH evaluado se debe a la presencia de una cantidad apreciable de ácidos urónicos, ya que a pH superiores a 1,8 ocurre la ionización de los grupos carboxilo contenidos en estos ácidos. Estos resultados indican que el mucílago puede emplearse como un polielectrolito aniónico en diversas tecnologías.

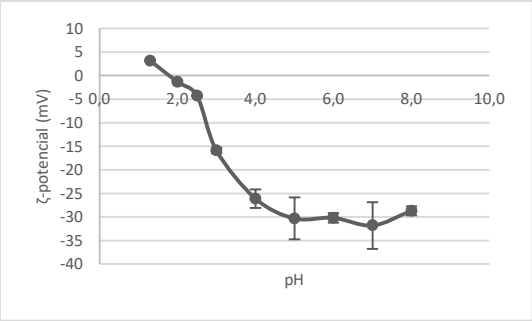


Figura 11. Curva de ζ-potencial del mucílago de chía (0,01%) a valores de pH comprendidos entre 1,3 y 8.

3.2.3. Mediciones de absorción de agua

Se realizó la medición de absorción de agua (**Figura 7**) para el punto óptimo de rendimiento (1:20 a 65°C y 210 min) y para el experimento 12 (1:10 a 45°C y 60 min) con el objetivo de tomar un punto que sea significativamente diferente en la relación FT/FO y viscosidad respecto al óptimo de rendimiento. La absorción de agua fue muy rápida en los primeros minutos y luego se tornó más lenta, tanto para el punto óptimo como para la muestra 12, alcanzando las condiciones de equilibrio aproximadamente a los 120 minutos de hidratación. Se puede observar que el mucílago de chía presenta una gran capacidad de absorción de agua ya que una muestra de 10 mg de mucílago, extraído mediante el experimento 12 y el punto óptimo, fue capaz de absorber a los 200 min 204 mg y 131 mg de agua, respectivamente. Estos valores están en el orden de los reportados por Muñoz et al., 2012 (230 mg agua/10 mg de mucílago). Por otro lado, se observaron diferencias significativas en la capacidad de absorción de agua según el método de extracción utilizado, enfatizando la importancia de tener en cuenta las condiciones de extracción al momento de describir las características del mucílago.

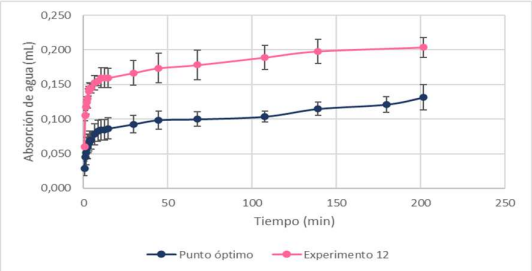


Figura 7. Curvas de absorción de agua del mucílago de chía extraído mediante experimento 12 y punto óptimo.

4. Conclusiones

El mucílago de chía se extrajo de manera eficiente utilizando US, lo que permitió que el mucílago se desprenda fácilmente de las semillas de chía. El diseño Doehlert permitió conocer las condiciones óptimas de extracción para obtener el máximo rendimiento y controlar así la relación FT/FO, y los parámetros reológicos.

Las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento fueron 1:20 de relación semilla:agua, 65ºC de temperatura y 210 minutos de tiempo de extracción. Se obtuvo un mayor rendimiento de extracción a tiempos y temperaturas más bajas que los utilizados por otros autores (Muñoz et al., 2012; Timilsena et al., 2016), lo que podría atribuirse al uso de US permitiendo una extracción más eficiente.

La máxima relación FT/FO (mayor fase traslúcida) se indicó para una relación semilla:agua de 1:20, temperatura de 26,8ºC y tiempo de extracción cercano a los 30 minutos, mientras que la mínima relación FT/FO (mayor fase opaca) se logró para una relación semilla:agua 1:10, 35°C y 30 minutos. De esta manera, se demostró que es posible modular la viscosidad del mucílago a partir de las condiciones de extracción utilizadas, principalmente la relación semilla:agua que permite obtener diferentes volúmenes de FT y FO, las cuales a su vez presentan diferente viscosidad. En consecuencia, se podrían seleccionar las condiciones de extracción dependiendo de las características tecnológicas deseadas.

Con respecto a la caracterización realizada, el diámetro promedio del mucílago, obtenido por dispersión estática de luz, fue de 0,26 µm y mediante la evaluación del potencial ζ se observó que se comportó como un polielectrolito aniónico a valores de pH comprendidos entre 1,8 y 8. Estos resultados indican que puede emplearse en diversas tecnologías, como por ejemplo en coacervación compleja para nano/microencapsulación de diversos ingredientes bioactivos (Timilsena et al., 2016). La capacidad de absorción de agua se encuentra en el rango de lo reportado en la literatura; sin embargo, se observaron diferencias en este último parámetro en función de la condición de extracción. En futuros trabajos, se seguirá estudiando la caracterización fisicoquímica y funcional de los diferentes mucílagos de chía obtenidos en este trabajo, haciendo foco en la evaluación de la influencia de las condiciones de extracción sobre las propiedades del mucílago extraído.

5. Referencias

Brütsch L, Stringer FJ, Kuster S, Windhab EJ, Fischer P. (2019). *Mucílago de semilla de chía - Un espesante vegano: Aislamiento, adaptación de viscoelasticidad y rehidratación*. Funct de alimentos. 10 (8): 4854–60.

Campos BE, Dias Ruivo T, da Silva Scapim MR, Madrona GS, de C. Bergamasco R. (2016) *Optimización del proceso de extracción de mucílagos de semillas de chía y aplicación en helado como estabilizador y emulsionante*. LWT - Food Sci Technol. 65: 874–83.

Castejón N, Luna P, Señorans FJ. (2017). *Eliminación ultrasónica de mucílagos para la extracción líquida a presión de aceite rico en omega-3 de semillas de chía (Salvia Hispanica L.)*. J Agric Food Chem. 65 (12): 2572–9.

Coorey R, Tjoe A, Jayasena V. (2014). *Propiedades gelificantes de la semilla y harina de chía*. J Food Sci. 79 (5).

Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. (2017). *Extracción asistida por ultrasonido de alimentos y productos naturales. Mecanismos, técnicas, combinaciones, protocolos y aplicaciones*. Una revisión. Ultrason Sonochem [Internet]. 34: 540–60. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

Chen XQ, Zhang Y. (2007). *Extracción asociada a ultrasonidos de polisacáridos solubles en agua de piñones coreanos desgrasados*. J Para Res. 18 (2): 133–5.

Doehlert DH. (1970). Diseños uniformes de redes. Appl Statistics 19: 231–9. En: Appl Statistics. 1970. p. 231–9.

Fabre JF, Lacroux E, Valentin R, Mouloungui Z. (2015). *La ecografía como método altamente eficiente de extracción de mucílagos de linaza*. Ind Crops Prod. 65: 354–60.

Fernandes SS, Mellado M de las MS. (2018). *Elaboración de Mayonesa con Sustitución de Aceite o Yema de Huevo por Adición de Mucílago de Chía (Salvia Hispânica L.)*. J Food Sci. 83 (1): 74–83.

García-Salcedo ÁJ, Torres-Vargas OL, del Real A, Contreras-Jiménez B, Rodríguez-García ME. (2018). *Propiedades pegajosas, viscoelásticas y*

fisicoquímicas de la harina y mucílagos de chía (Salvia hispanica L.). Estructura alimentaria [Internet]. 16: 59–66. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.foostr.2018.03.004

Gheybi N, Pirouzifard M. K, Almasi H. (2021). *Ornithogalum cuspidatumcuspidatum mucilage as a new source of plant-based polysaccharide: Physicochemical and rheological characterization. Journal of Food Measurement and Characterization. 15:2184–2201* https://doi.org/10.1007/s11694-021-00814-z

Goh KKT, Matia-Merino L, Chiang JH, Quek R, Soh SJB, Lentle RG. (2016). *Las propiedades físico-químicas del polisacárido de la semilla de chía y su reología de dispersión de microgel*. Carbohydr Polym [Internet]. 149: 297–307. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.126

Hesarinejad, M.A., Razavi, S.M.A. y Koocheki, A. (2015). *Alyssum homolocarpum seed gum: dilute solution and some physicochemical properties*. Int. J. Biol. Macromol. 81, 418–426.

Hromádková Z, Ebringerová A, Valachovič P. (1999). *Comparación de extracción clásica y asistida por ultrasonido de polisacáridos de Salvia officinalis L*. Ultrason Sonochem. 5 (4): 163–8.

Hromádková, Z., Ebringerová, A., Valachovicˇ P. (2002). *Extracción asistida por ultrasonido de polisacáridos solubles en agua de las raíces de la valeriana (Valeriana officinalis L.)*. Ultrason Sonochem. 9 (1): 37–44.

Huang, J. y Zhou, L. (2014). *Peach gum polysaccharide polyelectrolyte: preparation, propertiesand application in layer-by-layer selfassembly*. Carbohydr. Polym. 113, 373–379.

Hussain N, Ishak I, Sulaiman R, Fauzi NM, Coorey R. (2020). *Influencia de las condiciones de procesamiento en las propiedades reológicas del extracto acuoso de mucílago de chía (Salvia hispanica l.)*. Food Res. 4: 227–36.

Jiménez-Flores AL, Gómez Luna BE, Ramírez Granados JC, García Miler BE, Martinez Rios A, Torres Lopez RA, et al. (2005). *Efecto del ultrasonido y la agitación mecánica en la extracción del mucilago de las semillas de Hyptis suaveolens*. 1–5.

Li J wei, Ding S dong, Ding X lin. (2007). *Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos de polisacáridos de Zizyphus jujuba cv. jinsixiaozao*. J Ing. Alimentos. 80 (1): 176–83.

Lin KY, Daniel JR, Whistler RL. (1994). *Estructura del exudado de polisacárido de semilla de chía*. Carbohydr Polym; 23 (1): 13–8.

Ma, F., Wang, D., Zhang, Y., Li, Y., Qing, M.W., TikkanenKaukanen, C., Liu, X., y Bell, A. (2018). *Characterisation of the mucilage polysaccharides from Dioscorea opposite Thunb. with enzymatic hydrolysis*. Food Chem. 245, 13–21.

Martin, A., Freitas, R., Sassaki, G., Evangelista, P. y Sierakowski, M. (2017). *Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of Pereskia aculeate*. Food Hydrocoll. 70, 20–28.

Masuelli M. (2018). *Determinación de la viscosidad intrínseca de biopolímeros de alto peso molecular mediante diferentes métodos de trazado*. Estuche de chicle. J Polym Biopolym Phys Chem. 6 (1): 13–25.

Muñoz LA, Cobos A, Díaz O, Aguilera JM. (2012). *Semillas de chía: Microestructura, extracción e hidratación de mucílagos*. J Ing. Alimentos; 108 (1): 216–24.

Orifici SC, Capitani MI, Tomás MC, Nolasco SM. (2018). *Optimización de la extracción de mucílagos de semillas de chía (Salvia hispanica L) mediante metodología de superficie de respuesta*. J Sci Food Agric. 98 (12): 4495–500.

Pereira GA, Silva EK, Peixoto Araujo NM, Arruda HS, Meireles MAA, Pastore GM. (2019). *Obtención de un mucílago novedoso a partir de semillas de mutamba explorando diferentes condiciones de proceso de ultrasonido de alta intensidad*. Ultrason Sonochem [Internet]. 55 (enero): 332–40. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.01.010

Punia S, Dhull SB. (2019). *Mucílago de semilla de chía (Salvia hispanica L.) (un heteropolisacárido): Comportamiento funcional, térmico, reológico y su utilización*. Int J Biol Macromol [Internet]. 140: 1084–90. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.205

Salgado-Cruz M de la P, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez J, Farrera-Rebollo RR, Méndez-Méndez J V., Díaz-Ramírez M. (2013).

Caracterización de liberación de mucílagos de semillas de chía (Salvia hispanica L.). Estudio microestructural y de análisis de imágenes. Ind Crops Prod [Internet].; 51: 453–62. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.036

Segura-Campos MR, Ciau-Solís N, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. (2014). *Propiedades químicas y funcionales de la goma de semilla de chía (Salvia hispanica L.)*. Int J Food Sci.

Timilsena YP, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B. (2016). *Características moleculares y funcionales de la goma purificada de semillas de chía australianas*. Carbohydr Polym [Internet]. 136: 128–36. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.035

Timilsena, YP, Wang, B., Adhikari, R. y Adhikari, B. (2016). *Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates*. Food Hydrocolloids, 52: 554–563

Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ. (2001). *Investigación de los efectos del ultrasonido en tejidos vegetales durante la extracción por solvente*. Ultrason Sonochem. 8 (2): 137–42.

Zettel V, Hitzmann B. (2018) *Aplicaciones de la chía (Salvia hispanica L.) en productos alimenticios*. Trends Food Sci Technol [Internet]. 80 (julio): 43–50. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.011

Zhao X, Qiao L, Wu AM. (2017). *Extracción eficaz del mucílago de semillas adherentes de Arabidopsis mediante tratamiento ultrasónico*. Sci Rep [Internet]. 7: 1–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/srep40672

Thermodynamics by N. Newman, pp 257-267. Ann Arbor Sci. Publishers, Michigan. USA.

Kong, S.Y.; Kugai, R.J. (2003). *Binary Diffusion Coefficients for Fatty Acids in Supercritical CO_2,* 6th European Congress on Supercritical Fluids, 132-138, Tours, Francia Sept. 46.

Alarcón, R. (2003). *Determinación de Difusividades de Gases a Alta Presión en Sólidos Porosos,* Tesis de Grado, Dpto. Ing. Mecánica, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

24TCA - Comparación de las propiedades mecánicas y ópticas de películas compuestas de WPI+pectina adicionadas con miel de abejas sin aguijón o de *Apis mellifera*

Comparison of mechanical and optical properties between films composed of WPI + pectin added with honey from stingless bees or *Apis mellifera*

CASTRO Jessica[1,2], BERTOLA, Nora[3], ROMERO Cecilia A[1], OSUNA Mariana B.[1,2]

1. Universidad Nacional del Chaco Austral - Comandante Fernández 755 – CP3700 - Tel:(54) 0364-4420137 - Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.
2. Instituto de Investigaciones en Procesos Tecnológicos Avanzados (INIPTA); (CONICET -UNCAUS). Comandante Fernández 755 – CP3700 - Tel:(54) 0364-4420137 - Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.
3. CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata CONICET, 47 y 116 1900 La Plata, Provincia Buenos Aires, Argentina.
   E-mail: jesilcas29@gmail.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue comparar las propiedades mecánicas y ópticas (color y transparencia) de las películas compuestas con WPI+ pectina (PEC) adicionadas con diferentes concentraciones de miel de abejas sin aguijón (ANSA) o *Apis Mellifera* (AM). Las películas se elaboraron mediante el método de coacervación compleja con una proporción final de cada polímero de 1:1. La miel de ANSA o de AM como plastificantes, fueron adicionadas en las diferentes concentraciones (60%, 80% y 100%, p/p polímero total) a las soluciones formadoras de película compuesta de WPI+PEC. En los resultados se puede observar que la adición de miel produjo diferencias significativas ($p<0,05$) sobre el esfuerzo a la rotura y el módulo elástico, especialmente con las películas con 60% de miel de ANSA. La elongación a la rotura también se vio afectada significativamente ($p< 0,05$) siendo las de 80% de miel de AM las de mayor elongación. Las propiedades ópticas (transparencia y diferencia de color) de las películas compuestas no se vieron afectadas significativamente ($p>0,05$) ni por las diferentes concentraciones ni por el tipo de miel adicionada. Se puede concluir que las películas compuestas de WPI+PEC con miel de ANSA fueron más rígidas y oscuras que las con AM.

Palabras clave: películas compuestas, miel de abejas sin aguijón, miel de *Apis mellifera*, plastificantes.

Abstract

The objective of the present work was to compare the mechanical and optical properties (color and transparency) of the films composed with WPI + pectin (PEC) added with different concentrations of honey from stingless bees (ANSA) or *Apis mellífera*(AM). The films were made by the complex coacervation method with a final ratio of each polymer of 1: 1. ANSA or AM honey as plasticizers was added in different concentrations (60%, 80% and 100%, w / w total polymer) to the WPI + PEC composite film-forming solutions. In the results it can be observed that the addition of honey produced significant differences ($p <0.05$) on the stress at break and the elastic modulus, especially with the films with 60% ANSA honey. Elongation at break was also significantly affected ($p <0.05$), with 80% honey from AM being the ones with the highest elongation. The optical properties (transparency and color difference) of the composite films were not significantly affected ($p> 0.05$) neither by the different concentrations nor by the type of honey added. It can be concluded that the WPI + PEC composite films with ANSA honey were stiffer and darker than those with AM.

Keywords: composite films, stingless honey, *Apis mellifera* honey, plasticizers.

1. Introducción

Las películas comestibles son una alternativa para proteger los productos hortofrutícolas antes y durante la postcosecha y, así mejorar y prolongar su calidad.
Las películas se definen como una capa delgada de material comestible que son elaboradas por separado y luego se colocan en la superficie a envasar. Están formadas por lo general por tres componentes (un polímero, un disolvente y un plastificante)(Solano-Doblado et al., 2018).
Los polímeros sintéticos utilizados comúnmente son cuestionables debido a la contaminación ambiental que ocasionan, ya que su fuente es el petróleo. Por lo tanto, una alternativa es el empleo de biopolímeros que tienen la característica de poder desecharse después de su uso de una manera económica y ecológicamente amigable con el medio ambiente, además de poder ser vehículo de sustancias biactivas (Seok-In Hong, 2005). Dentro de los biopolímeros que se utilizan se encuentran los polisacáridos, proteínas, lípidos y sus compuestos procedentes de materias primas vegetales y animales comestibles.
Las proteínas aisladas del suero de leche (WPI) se han empleado en la elaboración de las películas. Pero presentan el inconveniente de proporcionar una baja resistencia a la tracción. Es por ello, que conviene complementarla con un polisacárido para mejorar sus características (Solano-Doblado et al., 2018). Uno de los polisacáridos más utilizado es la pectina (PEC), que constituye el principal componente de la pared celular vegetal. Estas presentan biodegradabilidad, son biocompatibles, comestibles y tienen propiedades fisicoquímicas versátiles, brindándole así mejores características mecánicas y adhesividad a las películas.
Una película o recubrimiento compuesto consiste ya sea en biopolímeros combinados para formar una bicapa o un conglomerado (Krochta et al., 1994). Los trabajos de investigación sobre films compuestos de pectina y WPI son escasos (Di Pierro, Rossi Marquez, Mariniello, Sorrentino, & Porta, 2013; Marquez et al., 2017; Farahnaky et al., 2018; Silva, Fonseca, Amado, & Mauro, 2018), por los que resulta interesante trabajar con estos residuos de la industria alimentaria argentina. Sin embargo, se requiere el agregado de un plastificante para reducir la fragilidad y otorgar rigidez (Bermúdez-Oria et al., 2017). La adición de un plastificante adecuado produce cambios microestructurales en la matriz polimérica, lo que implica una reducción en las fuerzas intermoleculares entre cadenas poliméricas. Pero se debe tener en cuenta que, por encima de una concentración crítica del plastificante, puede producirse una separación de fases o al menos una exclusión del plastificante de la matriz polimérica. Los plastificantes de uso común en biopolímeros son sorbitol, polioles y glicerol (Yang & Paulson, 2000).
Debido a que la actividad apícola en el noreste argentino, especialmente Chaco, ha aumentado considerablemente en los últimos años es que se considera emplear la miel como plastificante para la elaboración de las películas comestibles.
La miel producida por abejas sin aguijón (ANSA) y *Apis Mellífera* (*AM*) es un producto natural y comercializado en todo el mundo. Ambos tipos contienen únicos y distintos compuestos de variable importancia nutricional y biológica.
Debido a lo expuesto anteriormente, este trabajo plantea la elaboración de películas compuestas utilizando mezclas de polímeros (WPI + PEC) y como plastificante la miel de ANSA y *AM* en diferentes concentraciones (respecto al polímero) para realizar una comparación de las propiedades mecánicas y visuales que le brindan cada una de ellas.

2. Materiales y métodos

a. Materiales

El aislado de proteína de suero de queso (WPI) (96,2% de proteína, 1,54% de ceniza y 2,01% de humedad) fue proporcionado por Arla Foods Ingredients S.A. (Arla Foods Ingredients, Córdoba, Argentina). La pectina de manzana con alto contenido de metoxilo (pectina Andre tipo APA103, con un grado de esterificación del 66%), extraída de orujo de manzana, fue amablemente suministrada por Grupo Saporiti S.A (Grupo Saporiti, Buenos Aires, Argentina). La miel de *Apis mellifera* fue amablemente suministrada por Mieles del Chaco S.A (Chaco, Argentina) y la miel de abeja sin aguijón fue recolectada de meliponarios propios.

b. Métodos

i. Elaboración de las películas compuestas

Las películas compuestas se obtuvieron utilizando el método de coacervación compleja descripto por Silva y col. (2018). Las dos soluciones madres, una con 8% de WPI y otra con 2,85% de PEC se mezclaron de manera de obtener una proporción 1:1 con respecto al peso de cada polímero y se ajustó el pH final de la solución a 3. La miel de ANSA y miel de *AM* se adicionaron a soluciones formadoras de películas separadamente, pero en las mismas concentraciones (60%, 80% y 100%, p/p

polímero total). Las películas se prepararon mediante un método de moldeo en placas de Petri sembrando 15 g en cada una y se secaron bajo una estufa a 40ºC durante 12 hs.

ii. Determinación del espesor

El espesor de cada muestra se evaluó mediante un medidor de espesor (microprocesador CM-8826FN Coating Thickness Meter, Estados Unidos) en 5 puntos diferentes y se tomó el promedio.

iii. Análisis de las propiedades de textura de las películas

Se realizaron ensayos de fuerza en tensión mediante la metodología de ASTM D882-02 (2002)(American Society for Testing and Materials–ASTM) con algunas modificaciones. Se realizó por cuadruplicado en un texturómetro marca Brookfield (EE.UU.). Las películas se cortaron en áreas de 70 mm x 10 mm. Las condiciones de pruebas se establecieron en 50 N para la celda de carga con una velocidad de test de 1,00 mm/seg. A partir de las curvas fuerza vs distancia se obtuvieron los parámetros de textura característicos como el esfuerzo a la rotura (MPa), elongación de rotura (%) y módulo elástico o de Young (MPa).

iv. Transparencia

La transparencia se cuantifica como transmitancia, porcentaje de intensidad lumínica que atraviesa la muestra. Para esto se utiliza un colorímetro o un espectrofotómetro. El valor de transparencia de las películas se determinó según el método ASTM (2012). Para esto se cortaron muestras en tiras de 4 x 1 cm, se colocaron en una celda de espectrofotómetro y se midieron la transparencia a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro UV-Visible, Thermo Fisher Scientific. Siendo la transparencia, el cociente entre absorbancia y espesor, con la absorbancia obtenida, se calculó la transmitancia mediante la siguiente ecuación:

$$Transparency = [\log \%T]/\mathrm{t} \quad (1)$$

donde t es el espesor de la película (mm).

v. Apariencia de las películas

La apariencia visual fue evaluada por comparación visual mediante fotos. Para ello se colocaron las películas compuestas en orden creciente de concentración de miel de ANSA y de AM; y se tomaron las fotografías en fondo blanco.

vi. Diferencia de color

Los parámetros de color (L*, a * y b *) de las películas se midieron utilizando un espectrofotómetro con esfera integradora EVO600PC, Thermo Fisher Scientific. Se utilizó la escala CIE-Lab con una fuente de luz D65 y un ángulo de observación de 10°. Se usó una película compuesta con la misma composición y teniendo como plastificante 40% de glicerol con respecto al polímero total (L*: 44,63, a*: 0,13 y b*: -0,03) como estándar para calcular la diferencia de color (ΔE^*) de las películas, usando la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \mathbf{(2)}$$

vii. Análisis estadístico de los datos

La prueba de Tukey se aplicó a un nivel de significancia del 5% para comparar las medias de las propiedades mecánicas y ópticas. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software estadístico Infostat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina).

3. Resultados y Discusión

3.1 Propiedades mecánicas

En la Figura 1, Figura 2 y Figura 3 se muestran las propiedades mecánicas, esfuerzo a la rotura, elongación a la rotura y módulo elástico respectivamente, de las películas compuestas plastificadas con miel de ANSA o AM.

La adición de miel como plastificante en diferentes concentraciones, produjo diferencias significativas ($p<0,05$) sobre el esfuerzo a la rotura y el módulo elástico. Hubo una tendencia en disminuir estas variables a medida que aumentaban las concentraciones del plastificante.

El esfuerzo a la rotura fue mayor en las películas con miel de ANSA, principalmente cuando se usó 60% de miel de esta especie.

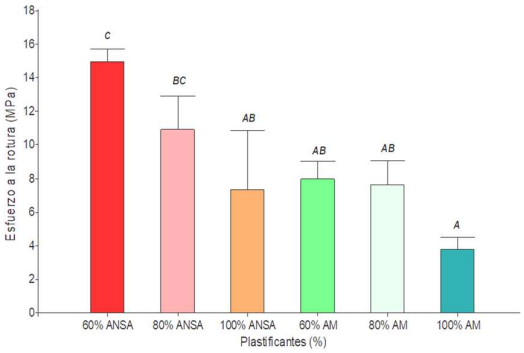


Figura 1. Esfuerzo a la rotura de películas compuestas de WPI+PEC plastificadas con diferentes contenidos de miel de ANSA o AM. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (p<0,05). ANSA: miel de abeja sin aguijón, AM: miel de *Apis Mellifera.*

La elongación a la rotura de las películas compuestas también se vio afectada significativamente (p< 0,05), siendo las muestras con miel de AM a partir del 80% las de mayor elongación.

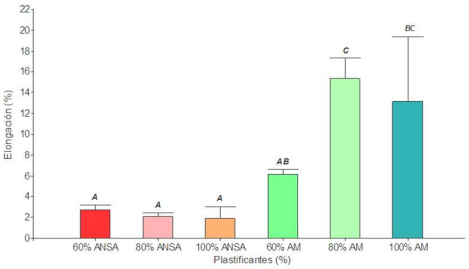


Figura 2. Elongación a la rotura de películas compuestas de WPI+PEC plastificadas con diferentes contenidos de miel de ANSA o AM. Las distintas letras sobre las barras indican que existen diferencias significativas (p<0,05). ANSA: miel de abeja sin aguijón, AM: miel de *Apis Mellifera*

El módulo elástico, tanto de las películas compuestas adicionadas por miel de ANSA o AM, disminuyeron al aumentar la concentración de las mismas. Las películas con miel de ANSA mostraron mayor rigidez que las películas con miel de AM, principalmente la con 60% de ANSA, la de mayor módulo elástico.

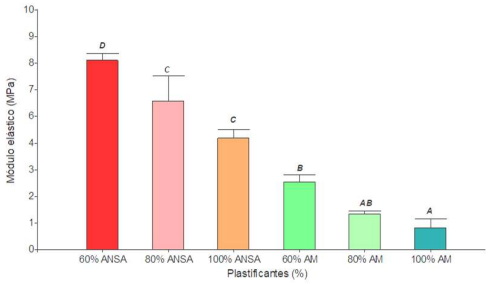


Figura 3 Módulo elástico de películas compuestas de WPI+PEC plastificadas con diferentes contenidos de miel de ANSA o AM. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (p<0,05). ANSA: miel de abeja sin aguijón, AM: miel de *Apis Mellifera*.

Los resultados de las propiedades mecánicas fueron similares a los encontrados por Soininen et al., (2013) para películas con 10% de WPI y plastificadas con diferentes concentraciones de miel de acacia o una mezcla binaria de monosacáridos, ya que mostraron la misma tendencia a disminuir la resistencia mecánica al aumentar la concentración de estos plastificantes en las películas de WPI. Gao et al., (2019) obtuvieron resultados similares en películas de almidón coplastificadas con azúcares. Además, los azúcares pueden inhibir la formación de estructuras intercaladas, generando una disminución de la resistencia mecánica de las películas. Saberi et al., (2017) también observó que la resistencia a la tracción y el módulo de Young disminuyeron y el alargamiento a la rotura aumentó en películas plastificadas con monosacáridos.

3.2 Propiedades ópticas

El color y la transparencia de las películas comestibles son dos índices importantes en términos de apariencia general y aceptación del consumidor. La luminosidad y la ΔE* de las películas compuestas con WPI + PEC no se vio afectada significativamente (p>0,05) ni por la concentración ni por el tipo de miel. Solo las películas con 60% de ANSA mostraron diferencias significativas (p<0,05) respecto a las variables de color a* y b *, siendo ésta más oscura, coincidiendo esto con la apariencia visual obtenida en la figura 4.
La Tabla 1 también mostró el porcentaje de transmitancia de luz de las películas compuestas con WPI+PEC determinado a 600 nm, lo que indica la transparencia de las películas. El aumento en la concentración de miel no produjo cambios en la transmitancia de la luz, es decir, transparencia y no mostró diferencias significativas (p> 0,05) con la película WPI plastificada con glicerol de referencia.

Se pudo concluir que las películas plastificadas con miel tenían propiedades de barrera a la luz comparables con las películas plastificadas con las de estándar.
Los resultados obtenidos fueron similares a los de Saberi et al., (2017)quien también observó una disminución de b* con la adición de monosacáridos como plastificante en películas de almidón. Sin embargo, se diferenciaron en que no hubo diferencia significativa en los valores de ΔE y L*. Los resultados de transparencia fueron inferiores a los obtenidos por Silva et al., (2018)para películas compuestas elaboradas con 5%WPI+2% PEC (pH 3.0).

Tabla 1. Propiedades ópticas de las películas compuestas de WPI+PEC plastificadas con diferentes contenidos de miel de ANSA o AM

Miel	Contenido del plastificante (%)	L*	a*	b*	ΔE	Transmitancia (%)
ANSA	**60**	46,07±0.06^{a}	0,27±0.12^{b}	1,77± 0,15^{b}	2,3±0.1^{a}	78.18±0,03^{c}
	80	46,33 ± 0.4^{a}	0,07± 0.06^{ab}	0,63± 0.06^{a}	1,83 ± 0.4^{a}	77,68±0,07^{b}
	100	46,01 ± 0.1^{a}	0 ± 0^{a}	0,63± 0.06^{a}	1,53 ± 0.06^{a}	80,40±0,07 ^{d}
AM	**60**	46,43±0.29^{a}	-0,07±0.06^{a}	0,37±0.12^{a}	1,83±0.29^{a}	74,54 ±0.09^{a}
	80	44,9±1,81^{a}	0,1±0.1^{ab}	0,6±0.17^{a}	1,57±0.61^{a}	85,55 ±0.07a ^{f}
	100	46,4±0.2^{a}	0,13±0.06^{ab}	0,67±0.06^{a}	1,9±0.2^{a}	83,42 ±0.07^{e}

^{a,b,c,d,e,f}Las medias dentro de la misma columna, etiquetadas con la misma letra, no difieren estadísticamente entre sí (p > 0.05). ANSA: miel de abeja sin aguijón, AM: miel de *Apis Mellifera*.

3.3 Apariencia visual

La apariencia visual de las películas compuestas con WPI + PEC muestran que las plastificadas con miel de ANSA fueron más oscuras, en comparación que con la de AM.

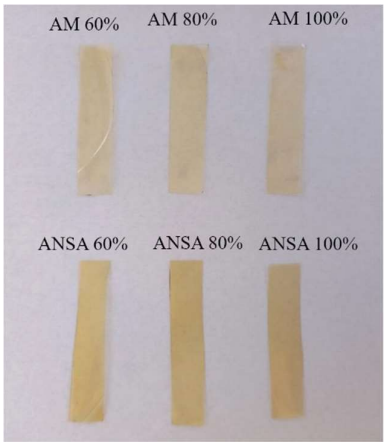


Figura 4. Fotografía de las películas compuestas con WPI+PEC plastificadas con diferentes contenidos de miel de ANSA o AM. ANSA: miel de abeja sin aguijón, AM: miel de *Apis Mellifera.*

4. Conclusiones

Las películas compuestas de WPI+PEC plastificadas con miel de ANSA produjo películas más rígidas, menos elásticas y más oscuras que las películas compuestas plastificadas con miel de *Apis mellifera*. La transparencia fue similar en ambos tipos de películas compuestas.

5. Referencias

ASTM. (2012). *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting,*.

Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. ASTM International., (2002).

Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Vioque, B., Rubio-Senent, F., & Fernández-Bolaños, J. (2017). Physical and functional properties of pectin-fish gelatin films containing the olive phenols hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol. *Carbohydrate Polymers*, *178*, 368–377. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.042

Di Pierro, P., Rossi Marquez, G., Mariniello, L., Sorrentino, A., & Porta, R. (2013). Effect of transglutaminase on the mechanical and barrier properties of whey protein/pectin films prepared at complexation pH (pHc). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 4593–4598.

Farahnaky, A., Sharifi, S., Imani, B., Dorodmand, M., & Majzoobi, M. (2018). Physicochemical and mechanical properties of pectin-carbon nanotubes films produced by chemical bonding. *Food Packaging and Shelf Life*, *16*(May 2017), 8–14. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.004

Gao, W., Liu, P., Li, X., Qiu, L., Hou, H., & Cui, B. (2019). The co-plasticization effects of glycerol and small molecular sugars on starch-based nanocomposite films prepared by extrusion blowing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *133*, 1175–1181. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.193

Krochta, J., Baldwin, E., & Nisperos-Carriedo, M. (1994). *Edible coatings and films to improve food quality* (J. Krochta, E. Baldwin, & M. Nisperos-Carriedo (eds.)). CRC Press LLC.

Marquez, G., Pierro, P., Mariniello, L., Esposito, M., Giosafatto, C., & Porta, R. (2017). Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase- crosslinked whey protein / pectin edible films. *LWT - Food Science and Technology*, *75*, 124–130. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.017

Saberi, B., Chockchaisawasdee, S., Golding, J., Scarlett, C., & Stathopoulos, C. (2017). Physical and mechanical properties of a new edible film made of pea starch and guar gum as affected by glycols, sugars and polyols. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 345–359. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.051

Silva, K., Fonseca, T., Amado, L., & Mauro, M. (2018). Physicochemical and microstructural properties of whey protein isolate-based films with addition of pectin. *Food Packaging and Shelf Life*, *16*(March), 122–128. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.005

Soininen, J., Heinämäki, J., & Yliruusi, J. (2013). From accacia honey monosaccharide content to a new external binary plasticizer applicable in aqueous whey. *Food and Bioproducts Processing*, *91*(4), 440–446. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.03.002

Solano-Doblado, L., Alamilla-Beltrán, L., & Jiménez-Martínez, C. (2018). Peliculas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *21*((Supl. 2)), 30–42. https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153

Yang, L., & Paulson, A. (2000). Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, *33*, 563–570.

25TCA - Detección de adulteración de mieles de abeja por medio de relaciones isotópicas de carbono.

Bee honey adulteration detection by carbon isotopic ratios.

Gisela Quiroga[1,2], Armando Dauverné[1,3], Angel Quiles[3].

1. CONICET.
2. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (UNCuyo).
3. UTN FRSR
   E-mail: lieca@mendoza-conicet.gob.ar

Resumen

Calidad, origen y adulteraciones son algunos de los aspectos que preocupan al consumidor de miel. Existen regulaciones internacionales que fijan límites a una variedad de parámetros asociados a dichas características y se han desarrollado distintas metodologías analíticas que permiten verificar el encuadramiento del producto dentro de dichos límites. La miel es un producto fácilmente adulterable y siendo Argentina uno de los mayores productores de miel a nivel mundial y en particular Mendoza un importante productor de miel multifloral es que cobra especial importancia para la economía regional la certificación del producto tanto para consumo interno como para exportación.
Los procesos asociados a la producción de miel natural implican que su precio sea considerablemente mayor al de otros edulcorantes como los azúcares de caña, remolacha o maíz, siendo por ello utilizados para adulterarla aumentando su volumen. En la última década, los isotopos del carbono se han utilizado ampliamente como marcadores para la detección de adulterantes que con otros métodos analíticos comunes son indetectables. El objetivo de este trabajo es determinar la sensibilidad de los valores de relación isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) en la miel al agregado de un edulcorante de uso común y mostrar la potencialidad del método para detectar adulterantes en mieles naturales y cuantificarlos.

Palabras clave: Isótopos estables, adulteración de alimentos, miel.

Abstract

Quality, origin and adulterations are some of the aspects that concern the honey consumer. There are international regulations that set limits to a variety of parameters associated with these characteristics and different analytical methodologies that allow verifying the framing of the product within those limits have been developed. Honey is an easily adulterated product and being Argentina one of the largest worldwide producers of honey and in particular, Mendoza, an important producer of multifloral honey, is particularly important for the regional economy to certify the product for both domestic consumption and export.
The processes associated with the production of natural honey imply that its price is considerably higher than that of other sweeteners such as sugar cane, beet or corn, and is therefore used to adulterate it by increasing its volume. In the last decade, carbon isotopes have been widely used as markers for the detection of adulterants that are undetectable with other common analytical methods. The objective of this work is to determine the sensitivity of carbon isotopic ratio (δ13C) values in honey respect to the aggregation of a commonly used sweetener and show the potential of the method to detect adulterants in natural honey and quantify them.

Keywords: Stable isotopes, food adulteration, honey.

1. Introducción

La miel natural de abeja es rica en nutrientes que son esenciales para el cuerpo humano, incluyendo azúcares, macro y microelementos, y sustancias biológicamente activas (Smanalieva *et al*, 2009, Yilmaz *et al*, 2014). Los componentes principales de la miel son agua y azúcares (80% carbohidratos y 17% agua), también proteínas, sabores, aromas, pigmentos, vitaminas, aminoácidos libres, minerales y varios componentes volátiles (González *et al*, 1998). Las labores asociadas a la producción de miel natural implican que su precio sea mayor que el de otros edulcorantes como el azúcar de caña, de remolacha o de maíz. Estos edulcorantes más económicos se han vuelto los principales adulterantes en la miel, en particular distintos tipo de jarabes como el de glucosa, de sacarosa, de azúcar invertida y el de maíz de alta fructosa (JMAF) (Guler *et al*, 2014 y Tosun 2013). En la última década, los isotopos del carbono se han vuelto una herramienta analítica común para la detección de adulterantes en la miel. Su aplicación se basa en la transmisión de una "firma" de carbono desde la planta con la que se alimenta la abeja a su cuerpo y a la proteína de la miel.

La relación isotópica de carbono $^{13}C/^{12}C$ presentes en los compuestos carbonados de plantas monocotiledóneas (denominadas C_4, como la caña y el maíz) difiere de las de plantas dicotiledóneas (denominadas C_3). La principal razón de esta diferencia radica en la forma en la que fijan el CO_2 atmosférico; las plantas C_3 fijan al CO_2 directamente en el ciclo de Calvin y las plantas C_4 antes del ciclo de Calvin.

Los valores $\delta^{13}C$ (relación $^{13}C/^{12}C$) en plantas C_3 varían desde -23‰ a -28‰ y para plantas C_4 de 9‰ a -15‰ (Cabanero *et al.,* 2006, Ruiz-Matute *et al.,* 2010 y Cengiz *et al.,* 2014).

El valor $\delta^{13}C$ en la miel natural ha mostrado ser relativamente uniforme. El agregado de jarabes de azúcar de caña y maíz modifican el valor $\delta^{13}C$ de la miel. Los valores $\delta^{13}C$ para el azúcar de caña varían entre -11.3‰ y -11.8‰ y los $\delta^{13}C$ de azúcar de maíz entre -9.72‰ y -9.78‰ (Xu *et al.*, 2020).

Por ello el análisis de relaciones isotópicas de carbono es utilizado para detectar adulteraciones en la miel con azúcares de plantas C_4 (como el de caña o el de maíz), pero no es aplicable para determinar adulteraciones con azúcares provenientes de plantas C_3 (como el de remolacha) ya que las abejas recogen el néctar de plantas C_3 (Wang *et al*., 2021).

El objetivo del trabajo fue determinar la sensibilidad de los valores $\delta^{13}C$ en la miel al agregado de un adulterante común como el azúcar de caña y mostrar la potencialidad del método de relaciones isotópicas para detectar cuantitativamente adulteraciones en mieles naturales.

2. Materiales y métodos

Preparación de las muestras:
Se utilizó miel multifloral natural pura y versiones adulteradas con jarabes de azúcar de caña en distintas proporciones, abarcando un rango de 0% (m/m) de adición (para miel pura) y 100% (m/m) de adición (para adulterante puro).

Para las determinaciones se pesaron nuestras de 1g (miel pura y adulteradas) que se diluyeron en 10mL de agua ultra purificada, luego se colocaron 3 µL de cada solución diluida en cápsulas de estaño de 5mm x 3.5mm. En las figuras 1 y 2 se pueden ver las distintas soluciones preparadas y las cápsulas.

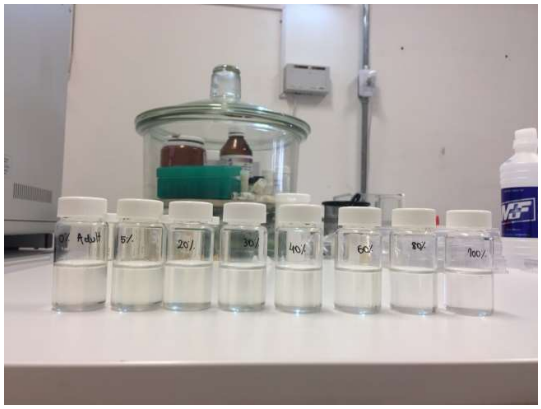


Figura 1. Soluciones con porcentajes variables de adulteración.

Figura 2. Las muestras se colocan en cápsulas de estaño para ser introducidas al espectrómetro.

Análisis de Isotopos Estables:
Los análisis de isotopos estables fueron llevados a cabo usando un Espectrómetro de masas de Relaciones Isotópicas IRMS por sus siglas en inglés

(Finnigan DeltaV Advantage, Thermo Fisher Scientific Corp, Bremen, Germany) en el laboratorio de Isotopos Estable en Ciencias Ambientales (LIECA) de la Universidad Tecnológica Nacional, Regional San Rafael (UTN-SR), acoplado a un analizador elemental (Flash 2000, Thermo Scientific) para medir relaciones $^{13}C/^{12}C$. En las figuras 3 y 4 se pueden ver los equipos mencionados.

La relación de isotopos de Carbono de cada muestra fue reportada en la notación δ en unidades por mil expresada por el cociente entre el valor $^{13}C/^{12}C$ de la muestra y el valor $^{13}C/^{12}C$ de un estándar aceptado internacionalmente como Pee Dee Belimnite (PDB, $CaCO_2$ carbonato de calcio de origen marino proveniente de la formación Cretácica Peedee en Carolina del Sur, Pee Dee Belemite Limestone).

Figura 3. Analizador elemental Flash 2000.

Figura 4. Espectrómetro de masas de Relaciones Isotópicas DeltaV Advantage.

Se utilizaron los estándares Cafeína LIECA 2017 ($\delta^{13}C$ = -33.02) y USGS 41a ($\delta^{13}C$ = 36,55) para normalización y colágeno LIECA 2017/1 ($\delta^{13}C$ = -18,16) como control.

Se calculó la incertidumbre asociada a las mediciones teniendo en cuenta los valores de incertidumbre de los estándares utilizados, las desviaciones estándar de los valores medidos en muestras y estándares repetidos en la secuencia, según recomienda en su trabajo Szpack *et al.,* 2017. De la triple repetición de cada muestra se obtuvo una desviación estándar promedio de 0,032‰ y de la secuencia completa un valor de incertidumbre asociado a la medición de 0,050‰.

Los valores $\delta^{13}C$ en mieles provenientes de plantas C_3 varían entre -21.9‰ y -30.4‰. La combinación derivada de mezclas en diversas proporciones de la miel de abeja y los adulterantes tipo C_4 provocan que el resultado del análisis de $\delta^{13}C$ se desplace hacia el valor de -9.7‰. Por lo tanto, cuando no existe adulteración, los valores de $\delta^{13}C$ de la miel analizada y el valor $\delta^{13}C$ de la fracción de proteína contenida en ella serán iguales y cuando exista adulteración se espera que la diferencia sea proporcional a la cantidad de adulterante.

3. Resultados y Discusión

Los resultados de las mediciones se pueden apreciar en el gráfico de la Figura 5. En ella se observa una relación proporcional entre el porcentaje de adulteración de la miel y la desviación del valor de relación isotópica de carbono.

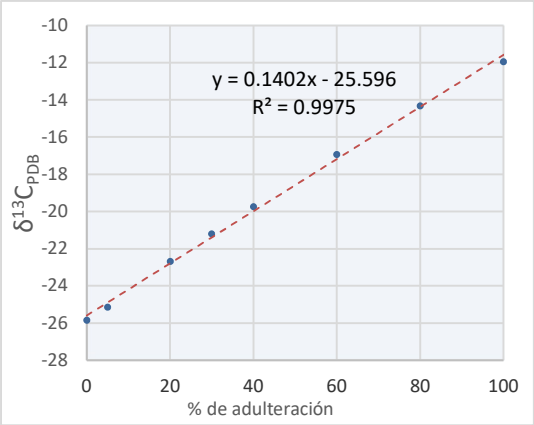


Figura 5. Curva de proporcionalidad entre el porcentaje de adulteración y la relación isotópica.

4. Conclusiones

El método de detección de adulteración de mieles con agregados de azúcares provenientes de plantas C_4 por medio de análisis de isotopos del carbono es una herramienta que no solo permite determinar si una miel está adulterada, sino que además permite realizar determinaciones cuantitativas de la adulteración. Hay que destacar que el valor $\delta^{13}C$ de distintas mieles puede variar, modificando la línea de base para la comparación y el problema en este caso sería disponer de miel pura proveniente de las mismas variedades florales para establecer dicha línea de base. Este inconveniente se puede subsanar tomando muestras testigo de fuentes confiables en zonas con variedades florales similares.

5. Referencias

Smanalieva J., Senge B. (2009), *Analytical and rheological investigations into selected unifloral German honey*, Eur. Food Res. Technol. (229), 107-113.

Yilmaz M.T., Tatlisu N.B., Toker O.S., Karaman S., Dertli E., Sagdic O., Arici M. (2014), *Steady, dynamic and creep rheological analysis as a novel approach to detect honey adulteration by fructose and saccharose syrups: correlations with HPLC-RID results*, Food Res. Int. (64), 634-646.

González M.I., Marques M.E., Sánchez S.J., González R.B. (1998), *Detection of honey adulteration with beet sugar using stable isotope methodology*, Food Chem. (61), 281-286.

Guler A., Kocaokutgen H., Garipoglu A.V., Onder H., Ekinci D., Biyik S. (2014), *Detection of adulterated honey produced by honeybee (Apis mellifera L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C3 and C4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis*, Food Chem. (155), 155-160.

Tosun M. (2013), *Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with 13C/12C isotope ratio analysis method*, Food Chem. (138), 1629-1632.

Cabanero A.I., Recio J.L., Ruperez M. (2006), *Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on honey adulteration detection*, J. Agric. Food Chem. (54), 9719-9727.

Szpak, P., Metcalfe, J. Z., & Macdonald, R. A. (2017). *Best practices for calibrating and reporting stable isotope measurements in archaeology*. Journal of Archaeological Science: Reports, 13, 609-616.

Ruiz-Matute A.I., Rodriguez-Sanchez S., Sanz M.L., Martinez-Castro I. (2010), *Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis*, J. Food Compos. Anal. (23), 273-276.

Cengiz M.F., Durak M.Z., Ozturk M. (2014), *In-house validation for the determination of honey adulteration with plant sugars (C4) by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IR-MS), LWT* - Food Sci. Technol. (57), 9-15.

Wang, Z., Ren, P., Wu, Y., & He, Q. (2021). *Recent advances in analytical techniques for the detection of adulteration and authenticity of bee products–A review.* Food Additives & Contaminants: Part A, 38(4), 533-549.

Xu, J., Liu, X., Wu, B., & Cao, Y. (2020). *A comprehensive analysis of 13 C isotope ratios data of authentic honey types produced in China using the EA-IRMS and LC-IRMS*. Journal of food science and technology, 57(4), 1216-1232.

26TCA - Optimización de la impregnación a vacío suave de naranjas frescas cortadas con miel

Optimization of soft vacuum impregnation of fresh cut oranges with honey

Gladys González-González[1,2], María Faicán[1,2]; Andrea Piagentini[1]; María Pirovani[1]

1. Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829. Santa Fe (3000), Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Santa Fe (3000), Argentina.
E-mail: mpirovan@fiq.unl.edu.ar

Resumen

La metodología de superficie de respuesta fue usada para evaluar el efecto de la presión de vacío (P:2-18 inHg) y el tiempo de tratamiento (t:14-42 min) en el color (L^*_i, C^*_{abi} y h_{abi}), firmeza (F_i), sólidos solubles (SS_i), vitamina C ($vitC_i$) y fenoles totales (FT_i) de naranjas impregnadas a vacío (NIV) con miel el día (i) del tratamiento (0 d) y luego del almacenamiento a 2 ºC (8 d). Las condiciones óptimas de P y t se determinaron usando la función de deseabilidad de Derringer (D) y bajo estas condiciones se realizaron ensayos de validación. Adicionalmente, se realizó un análisis descriptivo cuantitativo (ADC) de las NIV de validación frente a naranjas sin impregnar (NSI). Las respuestas afectadas por las variables del proceso fueron, L^*_0, F_0, SS_0, FT_0 y $vitC_8$ de las que se obtuvieron modelos predictivos. Las condiciones optimizadas fueron 16 inHg y 22 min y el ensayo de validación mostró acuerdo entre los valores experimentales obtenidos y los predichos para las respuestas utilizadas. Respecto al ADC, el día 0, la NIV era más dulce que NSI, con olor y sabor a miel. En el día 8, disminuyó el olor y sabor a miel, mientras que el dulzor se mantuvo. No se generaron sabores ni olores extraños en NIV. Los resultados indicaron que el uso de miel aplicada por IV tiene un gran potencial para la comercialización de un producto diferenciado.

Palabras clave: *Citrus sinensis*, procesamiento mínimo, optimización, metodología de superficie de respuesta

Abstract

Response surface methodology was used to evaluate the effect of vacuum pressure (P:2-18 inHg) and treatment time (t:14-42 min) on colour (L^*_i, C^*_{abi} y h_{abi}), firmness (F_i), soluble solids (SS_i), vitamin C ($vitC_i$) y total phenols (FT_i) of vacuum impregnated oranges (VIO) with honey on day (i) of treatment (0) and after storage at 2 °C (8 The Derringer desirability function (D) was used to determine the optimal conditions of P and t, under these conditions validation tests were performed. Additionally, a quantitative descriptive analysis (QDA) of the validation (OIV) was performed against non-impregnated oranges (NI0). The responses affected by the process variables were L^*_0, F_0, SS_0, FT_0 and $vitC_8$, from which predictive models were obtained. The optimized conditions were 16 inHg and 22 min and the validation test showed agreement between the experimental values obtained and those predicted for the responses used. Regarding QDA, on day 0, VIO were sweeter than NIO, with a smell and taste of honey. On day 8, the smell and taste of honey decreased, while the sweetness was maintained. No off- flavors or off- odors were generated in VIO. The results indicated that the use of honey applied by IV has great potential for the commercialization of a differentiated product.
.

Keywords: *Citrus sinensis,* minimal processing, optimization, response surface methodology

1. Introducción

Las naranjas son altamente valoradas por su importante contenido de vitamina C, entre otros compuestos nutritivos y benéficos para la salud (Rapisarda *et al*., 2008). Sin embargo, el consumo en fresco de esta fruta está limitado por la inconveniencia del pelado, especialmente por la transferencia de olor a las manos debido a la liberación de los aceites esenciales (Agostini *et al*., 2013). Al respecto, las características fisiológicas (no climatéricas) y morfológicas (estructura en gajos) de esta fruta y que sea tolerante al frío, la hacen adecuada para un mínimo procesamiento y formulación de un producto listo para consumo (Plaza *et al*, 2011). Por su parte, la miel es una rica fuente natural de carbohidratos y demás compuestos nutritivos y benéficos para la salud (Cajka *et al*., 2009) que al integrarse apropiadamente al tejido de la fruta podría incrementar la aceptabilidad y el potencial saludable. En este sentido, una alternativa para la incorporación de dichos ingredientes es la impregnación por vacío (IV), que es una técnica no destructiva utilizada para introducir una solución, con una composición específica, en matrices alimentarias porosas de manera controlada (Verma, 2017). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue modelar y optimizar la IV con miel de naranjas mínimamente procesadas, en un intento por mantener la calidad fresca de la fruta y mejorar la calidad del producto mediante la incorporación de miel.

2. Materiales y métodos

Recepción y acondicionamiento de materias primas

Las naranjas, obtenidas en un mercado local de la ciudad de Santa Fe, fueron lavadas con agua potable de red y se sumergieron en una solución clorada de 0,2 g L^{-1} de cloro activo durante 3 min. Luego, se escurrieron por gravedad, se almacenaron a 8.0 ± 1.0 ºC con 80% de HR durante no más de tres días y se procesaron. La miel se adquirió con productores de la zona de Monte Vera (Santa Fe) y se almacenó a 22 ± 1.0 ºC y 60% HR, desde la adquisición, hasta su uso.

Tratamiento de impregnación

Las naranjas, fueron peladas manualmente y cortadas en octavos con cuchillo. Por cada corrida, 800 ± 5 g de octavos de naranja se colocaron en una canasta de red plástica que fue sumergida en una solución osmótica (SO) de miel (50 °Brix), contenida en un recipiente apto para vacío (con las conexiones ad hoc para conectar una bomba de vacío). La relación SO/fruta fue de 1:6. Al término del tratamiento, los octavos fueron escurridos por gravedad durante 3 min, se eliminó el resto de la SO, apoyándolos sobre servilletas de papel absorbente (1 min de cada lado) y se registró el peso final.

El día de la impregnación, se analizaron octavos impregnados y octavos sin impregnar para determinar el efecto del tratamiento sobre las respuestas evaluadas. Adicionalmente, parte de los octavos impregnados (200 ± 5 g) se almacenó en cámara frigorífica (2.0 ± 0.5 °C), durante 8 días, para analizar los cambios después del almacenamiento. Para el envasado se utilizaron recipientes de tereftalato de polietileno (PET) de 0,42 mm de espesor, área superficial de 0,045 m2, con permeabilidad para O_2= 4,73 x 10^{-15} – 9,617 x 10^{-15} Kg m^{-2} s^{-1} Pa^{-1} (a 23°C y 0% de humedad relativa) y vapor de agua= 1,3x10^{-7} – 2,08x10^{-7} Kg m^{-2} s^{-1} Pa^{-1} (a 38°C y 90% de humedad relativa).

Diseño experimental

Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a un diseño de superficie de respuesta (RSM) factorial con dos variables y tres niveles por variable (Tabla 1), resultando en un total de 11 corridas experimentales (9 combinaciones y 2 repeticiones del punto central).

Tabla 1. Diseño experimental para la IV con miel de octavos de naranja

Variables	Niveles
Presión de vacío (P)	2, 10 18 inHg
*Tiempo de tratamiento (t)	14, 28 y 42 min

* la mitad del tiempo de tratamiento corresponde al tiempo de vacío y la otra mitad al tiempo de relajación

Las respuestas evaluadas fueron los cambios en el color (L^*_i, C^*_{abi} y h_{abi}), firmeza (F_i), sólidos solubles (SS_i), vitamina C ($vitC_i$) y fenoles totales (FT_i), según la ecuación 1.

$$Cambio(\%)=(X_i/X)*100 \quad (1)$$

Donde X_i, es el valor promedio del atributo evaluado en los octavos impregnados, el día (i) 0 u 8 del almacenamiento; X, es el valor promedio del atributo evaluado en los octavos frescos sin impregnar.

Se estableció la función matemática para cada una de las respuestas, en relación a los dos factores independientes (2):

$$y_i=f(P, t) \quad (2)$$

Donde $y_{i,}$ es la respuesta en el día (i) de almacenamiento; P, es la presión de vacío y t, el tiempo de tratamiento.

La ecuación propuesta para los modelos fue (3):

$$y_i=\beta_0+\beta_1 P+\beta_2 t+\beta_{12} Pt+\beta_{11} P^2+\beta_{22} t^2+\varepsilon_{12} \quad (3)$$

Donde β_0, β_1, β_2, β_{12}, β_{11}, β_{22}, son los coeficientes y ε_{12}, el error. Para el fiteo de los modelos propuestos se usaron variables no codificadas.

Optimización y validación

Las condiciones óptimas de P y t, para el tratamiento de IV con miel de octavos de naranja, se determinaron a través de la función de deseabilidad de Derringer (Derringer y Suich, 1980), que permite la optimización simultánea de múltiples respuestas. El método consiste en seleccionar las respuestas (y_i) a incluir en el proceso de optimización, transformando cada una de las respuestas en una función parcial de deseabilidad adimensional, d_i ($0 \leq d_i \leq 1$). Los valores de *di* para cada respuesta son obtenidos especificando los objetivos, esto es minimizando, maximizando o fijando un objetivo y condiciones de contorno necesarias para cada respuesta. Las funciones parciales de deseabilidad están combinadas en una sola respuesta compuesta, la función global de deseabilidad (D), definida como la media geométrica de los diferentes valores de d_i (4):

$$D=\left[d_1^{p1} \text{ x } d_2^{p2} \text{x...x } d_n^{pn}\right]^{1/n} \quad (4)$$

Donde, p1, p2 y pn corresponden a la importancia relativa asumida para cada respuesta. La importancia relativa puede ir desde 1 (menos importante) hasta 5 (más importante) (Maran y Manikandan, 2012). Se debe asignar un factor de peso, que defina la forma de la función de deseabilidad. Los factores de peso deben estar entre 0,1 y 10, los pesos altos corresponden a las respuestas más importantes.

Un valor de deseabilidad diferente de cero, implica que las respuestas se encuentran en un rango simultáneo deseable y consecuentemente para un valor de D cercano a 1, la combinación del criterio es globalmente óptima (Van de Velde *et al.,* 2014).

Para la validación de los modelos obtenidos para cada respuesta incluida en el proceso de optimización, se realizaron ensayos adicionales de IV bajo las condiciones óptimas de P y t obtenidas. Posteriormente, los resultados experimentales obtenidos en la validación se compararon estadísticamente vs valores predichos por los modelos para determinar si existían diferencias significativas.

Determinaciones analíticas

Color: determinado de acuerdo con Piagentini and Pirovani (2017), usando un espectrofotómetro Minolta (modelo CM-508d, Tokio, Japón) y se evaluaron los parámetros L* (luminosidad) C^*_{ab} (croma) y h_{ab} (ángulo de tono). Se hicieron 10 medida por tratamiento.

Firmeza: mediante un analizador de textura TA-XT Plus (Stable Micro System), con un test de penetración, utilizando una sonda cilíndrica de 8 mm de diámetro. Cada gajo se colocó de forma perpendicular a la sonda. La distancia y velocidad de penetración fueron de 10 mm y 2 mm/s, respectivamente, usando una celda de carga de 5 kg. Se usó el software Exponent para determinar la firmeza como fuerza máxima, expresada en N. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

Sólidos solubles (°Brix): Determinado mediante un refractómetro portátil digital PAL-ALFA (Atago Co. 124 Ltd, Tokio, Japón), medido por triplicado en pulpa homogeneizada.

Vitamina C: Determinada por HPLC, de acuerdo con Van de Velde *et al.,* (2012), expresando resultados como mg de ácido ascórbico por Kg de fruta fresca (mg AA Kg^{-1} FF). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Fenoles totales: por el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con Singleton y Rossy (1965) y modificado de acuerdo a Cortéz *et al*., (2018), usando un espectrofotómetro (Genesys 5, Milton Roy, Ivyland, USA). Los resultados se expresaron como mg ácido gálico equivalente por Kg de fruta fresca (mm AGE Kg^{-1} FF). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Análisis sensorial

Se realizó el análisis descriptivo cuantitativo (ADC) de los octavos de naranja impregnados de la validación, contra octavos de naranja frescos sin impregnar, para lo cual se requirió del panel sensorial entrenado del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), formado por 9 jueces (2 hombres y 7 mujeres), con experiencia en evaluar calidad de vegetales frescos. Previo al análisis de las muestras del ensayo, se realizaron sesiones de entrenamiento específico (Hough y Fiszman, 2005) con distintas muestras de naranja.

Para la evaluación se utilizó una escala lineal no estructura con términos ancla a 1 cm de cada extremo de la línea de 10 cm. La cuantificación se hizo midiendo la distancia del extremo izquierdo a la marca señalada por el panelista. Los términos anclas de izquierda a derecha y términos descriptores fueron los siguientes: "1: ligeramente perceptible" y "9: intenso" para olor típico, olor a miel, olor extraño, dulzor, acidez, sabor típico, sabor a miel y sabor extraño; "1: leve y "9: intenso" para color típico; "1: opaco" y "9: muy brillante" para brillo; y "1: blanda" y "9: firme" para textura.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV.II (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.) para realizar el análisis de los datos a través del ANOVA, ajustar los modelos propuestos, obtener los coeficientes de las ecuaciones y encontrar condiciones operativas optimizadas. Previamente, también se realizaron pruebas para verificar que los residuales cumplieran los supuestos de normalidad, independencia y aleatoriedad. Se evaluó la significancia de cada término del modelo y se refirió a los residuos totales. Para la verificación de la adecuación del modelo se calculó la prueba de falta de ajuste y la determinación del coeficiente de variación R^2. Cada modelo completo se redujo mediante el procedimiento de regresión lineal "stepwise".

3. Resultados y Discusión

Efecto de la IV con miel sobre las respuestas ensayadas

Las características iniciales de los octavos de naranja antes de la IV con miel eran: color = 41.4 ± 2.7; 27.4 ± 4.5 y 77.6 ± 2.3 para L*, C^*_{ab} y h_{ab}, respectivamente; firmeza (N) = 5.8 ± 1.4; sólidos solubles (°Brix) = 11.8 ± 0.3; fenoles totales (mgAG $Kg^{-1}FF$) = 651.0 ±33.9; vitamina C (mg AA $Kg^{-1}FF$) = 425.8 ± 11.5. Los cambios después del tratamiento de IV de los atributos ensayados se muestran en las Tablas 2 y 3. Los valores por debajo del 100% corresponden a una reducción en la respuesta, mientras que arriba de 100% indica un incremento.

El ANOVA de los modelos propuestos para estas respuestas indicó que los cambios en color, firmeza, sólidos solubles y fenoles totales, en el día 0 (CL_0^*, CF_0 y CSS_0 CFT_0, respectivamente), así como en vitamina C, al día 8 ($CVitC_8$), fueron función de las variables del proceso, sin exhibir falta de ajuste significativa (P>0.05) y con coeficientes de determinación aceptables (R^2>70) (Tabla 4). Por lo tanto, se obtuvieron los modelos correspondientes para estas respuestas. Para las demás respuestas, no fue posible obtener modelos.

El modelo CL^*_0 fue afectado por la presión en su término lineal (Tabla 4) y está representado en la figura 1, donde se puede observar que la luminosidad de los octavos de naranja impregnados disminuye conforme se incrementa la presión de vacío, en comparación con los octavos frescos son impregnar. A partir del modelo predictivo reducido obtenido para CL^*_0 (ecuación 5), se estimó que es posible mantener la luminosidad de los octavos impregnados en el día 0, similar a la de los octavos sin impregnar (CL^*_0= 101%), usando una presión de vacío y tiempo de tratamiento igual a 4 inHg y 29 min.

En el caso de los otros parámetros del color, que no fueron función de las variables del proceso, se estimó un valor promedio dentro del rango experimental ensayado (Tabla 2) al día 0 y día 8: CC^*_{ab0} = 105% y Ch_{ab0} = 100%, mientras que CL^*_8= 100%, CC^*_{ab8} = 115% y Ch_{ab8} = 104%. Se determinó un ligero incremento de la cromaticidad de los octavos impregnados en el día 0, sin cambios en el ángulo de tono. Después del almacenamiento, ocurre una aparente recuperación de la luminosidad y un incremento en cromaticidad y tono que se proyectan como incremento del color amarillo, en comparación con los octavos sin impregnar.

Reducciones en luminosidad, por efecto de la IV, han sido reportadas para rodajas de naranja impregnadas con sacarosa y para manzanas impregnadas con solución de miel silvestre, observándose también, en esta última algunos cambios después del almacenamiento (Cháfer *et al*., 2008; Jeon y Zhao 2005).

Tabla 2. Cambios en el color de octavos de naranjas IV con SO de miel (50 ° Brix)

Presión (inHg)	Tiempo (min)	i	CL* (%)	CC^*_{ab} (%)	Ch_{ab} (%)
10	28	0	97	112	98
		8	99	111	99
2	28	0	102	114	100
		8	98	101	105
2	14	0	99	108	101
		8	100	109	104
2	42	0	101	88	100
		8	103	124	106
18	28	0	91	99	100
		8	97	117	100
18	42	0	94	102	101
		8	96	100	104
10	14	0	98	100	99
		8	99	108	101
18	14	0	94	106	99
		8	95	106	104

10	28	0	100	105	103
		8	100	121	106
10	42	0	102	126	102
		8	106	133	106
10	28	0	101	96	100
		8	107	136	107

Tabla 3. Cambios en firmeza (CF), sólidos solubles (CSS), fenoles totales (CFT) y vitamina C (CVitC) de octavos de naranjas IV con SO de miel (50 ° Brix)

Presión (inHg)	Tiempo (min)	i	CF (%)	CSS (%)	CFT (%)	CVitC (%)
10	28	0	118	144	99	100
		8	127	150	132	98
2	28	0	88	146	107	115
		8	92	143	120	101
2	14	0	94	139	104	104
		8	100	141	121	105
2	42	0	121	147	121	113
		8	135	130	127	106
18	28	0	97	141	128	113
		8	128	143	133	96
18	42	0	95	155	108	95
		8	96	154	118	94
10	14	0	117	133	87	125
		8	123	134	134	99
18	14	0	80	141	117	103
		8	106	140	127	86
10	28	0	119	142	93	106
		8	120	138	124	99
10	42	0	115	145	114	116
		8	122	141	129	95
10	28	0	124	141	96	105
		8	142	140	125	101

Tabla 4. ANOVAs de los modelos propuestos para los cambios en color (CL*, CC*ab, Chab), firmeza (CF), sólidos solubles (CSS), fenoles totales (CFT) y vitamina C (CVitC)

Fuente	Gl	Suma de cuadrados						
		CL*	CC^*_{ab}	Ch_{ab}	CF	CSS	CFT	CVitC
i = 0 días								
P	1	92,04**	1,82	0,06	160,17	5,61	69,36	68,68
t	1	4,51	0,38	2,67	272,03	180,40*	211,23	12,04
P^2	1	21,04	74,09	0,18	1346,89 *	37,29	675,26 *	41,34
P*t	1	1,44	64,80	1,56	35,40	11,22	162,56	70,56
t^2	1	1,91	5,64	0,47	1,40	0,25	0,57	22,20
Falta ajuste	3	10,71	765,09	2,06	536,57	54,30	377,72	505,97
Error puro	2	11,25	129,89	9,36	19,05	2,45	14,09	17,66
R^2		84,4	13,6	29,7	77,32	80,6	74,7	27,9
i = 8 días								
P	1	23,21	20,17	6,41	2,28	77,04	14,73	220,83**
t	1	17,00	196,08	6,41	95,20	16,00	10.40	5,23
P^2	1	45,82	379,02	0,03	661,18	8,77	48,00	0,08
P*t	1	1,10	97,02	1,10	519,84	156,25	57,00	10,24
t^2	1	2,04	0,59	1,60	37,65	29,10	0,22	2,94
Falta ajuste	3	19,89	464,63	17,78	994,79	55,64	120,23	60,92
Error puro	2	33,26	306,11	37,05	246,85	77,42	36,62	3,85
R^2		62,2	48,7	22,1	54,0	67,9	45,7	78,7

* después de una cifra: significativo a P≤0,05; ** después de una cifra: significativo a p≤0,01; P: presión de vacío; t: tiempo de tratamiento; Gl: grados de libertad;

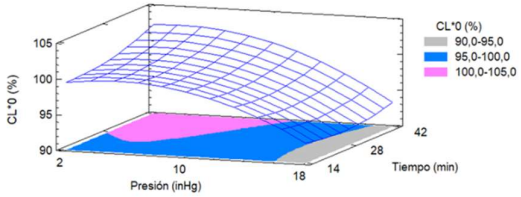


Figura 1. Gráfico de superficie y áreas de contorno para los cambios en la luminosidad al día 0 (CL*0) de octavos de naranja IV con miel

$$CL^*_0\ (\%) = 100{,}155 + 0{,}33854\ P - 0{,}04141\ P^2 \quad (5)$$

En el caso de CF_0 fue afectado por la presión en su término cuadrático (Tabla 4). En la figura 2, se puede observar que la firmeza (F) es superior en los octavos impregnados al usar presión media, en comparación con los octavos sin impregnar. Pero a presión mínima y máxima la F se reduce, principalmente en el tiempo más corto del tratamiento. A partir del modelo reducido para CF_0 (ecuación 6) se estimó que las condiciones óptimas para la menor modificación de la F son una presión de 15 inHg tiempo de tratamiento de 17 min.

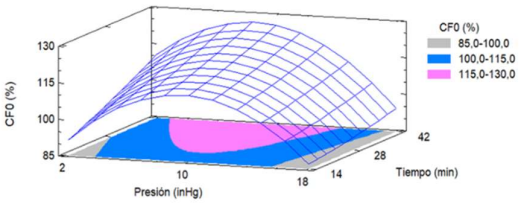


Figura 2 Gráfico de superficie y áreas de contorno para los cambios en la firmeza al día 0 (CF0) de octavos de naranja IV con miel

$$CF_0\ (\%) = 75{,}8329 + 6{,}49792P + 0{,}48095t - 0{,}35719P^2 \quad (6)$$

La tendencia predominante de la F a disminuir el día del tratamiento de IV, es consistente con lo mencionado por Zhao y Xie (2004), respecto a que la firmeza de un tejido vegetal puede ser disminuida al impregnarse con una solución hipertónica, debido a la presión ejercida por el fluido sobre la membrana celular. Después del almacenamiento el valor promedio para CF_8, (dentro del rango experimental, Tabla 3), fue 117%, indicando que los octavos impregnados y almacenados tenían mayor F que los frescos sin tratar. Al respecto, también otros autores han reportado el incremento de F en octavos de naranja almacenados, atribuyéndolo a la

deshidratación superficial debido a la pérdida de agua, durante el almacenamiento (Barrios *et al*., 2014; Karacay y Ayhan, 2010).

En cuanto a CSS_0 este fue función del tiempo de tratamiento (Tabla 4). Su representación en la figura 3 muestra que, en todos los tratamientos de IV, ocurrió un considerable incremento en el contenido de sólidos solubles de los octavos de naranja, siendo superior a mayor tiempo de tratamiento.

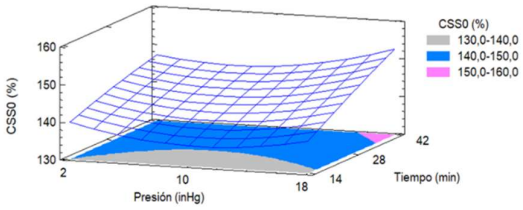


Figura 3 Gráfico de superficie y áreas de contorno para los cambios en los sólidos solubles, al día 0 (CSS0), de octavos de naranja IV con miel

Mediante el modelo reducido para CSS_0 (ecuación 7), se estimó un incremento de hasta 52%, al aplicar una presión de vacío de 18 inHg, durante 42 min.

$$CSS_0\ (\%) = 140{,}165 - 1{,}59167P + 0{,}24211t + 0{,}05865P^2 + 0{,}01496\ Pt \quad (7)$$

El incremento significativo de sólidos solubles (SS) después del tratamiento está justificado por el uso de una solución hipertónica, con una concentración 4 veces superior al contenido de SS de fruta fresca, y por la operación VI que promueve la transferencia de los sólidos presentes en la solución. El comportamiento respecto a esta respuesta es consistente con lo observado en otros estudios de impregnación de frutos (Cháfer et al., 2008; Roble et al., 2011). Los cambios en SS, después del almacenamiento (CSS_8), tenían un valor promedio de 141% (dentro del rango experimental, Tabla 3), indicando que los octavos retuvieron la mayor parte de los sólidos obtenidos el día del tratamiento IV (41%), siendo superior al de los octavos frescos sin tratar.

El modelo CFT_0 fue función de la presión en su término cuadrático (Tabla 4). En la figura 4. se puede observar que, a presión mínima y máxima de vacío, el contenido de fenoles (FT) de los octavos de naranja IV fue superior que en los octavos frescos sin impregnar. Sin embargo, en la presión media, se obtuvieron valores por debajo del 100%, indicando reducciones, excepto en el tiempo más prolongado del tratamiento. A partir del modelo reducido para CFT_0 (ecuación 8), se estimó un incremento máximo del 26%, usando una presión de vacío de 2 inHg y tiempo de tratamiento de 42 min.

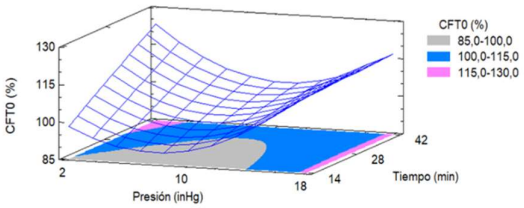


Figura 4 Gráfico de superficie y áreas de contorno para los cambios en los fenoles totales, al día 0 (CFT0), de octavos de naranja IV con miel

$$CFT_0\ (\%) = 95{,}2083 - 3{,}46875P + 0{,}99301t + 0{,}25313P^2 - 0{,}05692Pt \quad (8)$$

Después del almacenamiento, CFT_8 tenía un valor promedio de 126% (dentro del rango experimental, Tabla 3) indicando que los octavos impregnados tenían un contenido de FT 26% mayor al de los octavos frescos sin impregnar. Considerando los valores observados al día 0, el contenido de FT incrementó después del almacenamiento. Al respecto, se ha reportado previamente el incremento de FT en naranjas mínimamente procesadas, después del almacenamiento (Rapisarda *et al*., 2008; Plaza *et al*., 2011; Contreras-Oliva *et al*., 2012) y, de acuerdo con la literatura, se relaciona con la síntesis de metabolitos secundarios de los productos frescos cortados, como respuesta al estrés fisiológico (Francis *et al*., 2012; Pirovani *et al*., 2015).

Finalmente, los cambios en vitamina C el día 0 ($CVitC_0$) no fueron función de las variables del proceso y el valor promedio estimado (dentro del rango experimental Tabla 3) fue de 109%. Es decir, la vitamina C de los octavos de naranja se incrementó un 9% después del tratamiento de IV. Después del almacenamiento, $CvitC_8$ fue función de la presión de vacío en su término lineal (Tabla 4). En la figura 5 se puede observar que los octavos que fueron tratadas con mayor presión de vacío, son los que presentan mayores pérdidas. No obstante, se observaron ligeros incrementos (alrededor de 5%) en aquellos que fueron tratados con la presión mínima, en comparación con los octavos frescos sin impregnar.

Mediante el modelo reducido obtenido para $CvitC_8$ se estimó un incremento de hasta 6% en la vitamina C, después del almacenamiento, respecto a la fruta fresca sin impregnar, al usar una presión de vacío de 2 inHg y 14 min como tiempo de tratamiento.

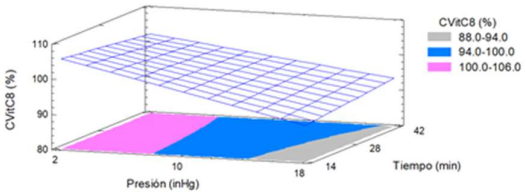


Figura 5 Gráfico de superficie y áreas de contorno para los cambios en vitamina C, al día 8 (CVitC0), de octavos de naranja IV con miel

$$CVitC_8\ (\%) = 109{,}629 - 1{,}15833P - 0{,}14286\ t + 0{,}0142857Pt \quad (9)$$

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Plaza *et al*. (2011) para gajos de naranja, los cuales indicaron una pérdida del 12%, luego de almacenamiento a 4 °C durante 8 días. De acuerdo con Agostini *et al*. (2013), se han reportado pérdida de entre 7 y 36% en el contenido de ácido ascórbico de frutas cítricas mínimamente procesadas, durante el almacenamiento y estas pérdidas están relacionadas con la degradación oxidativa que es estimulada por la presencia de luz, oxígeno, el calor y reacciones enzimáticas.

Optimización y validación

Una vez determinadas las respuestas que eran función del diseño y obtenidos los modelos, se propuso un escenario de optimización y los criterios fueron maximizar el contenido de SS y FT en el día 0, así como mantener la F similar a la fruta fresca (objetivo = 100%). Se les dio el mismo valor de impacto (1.0). Mediante la función de deseabilidad (D), se estimó que las condiciones óptimas de las variables del proceso, para cumplir con los objetivos planteados era una presión de vacío de 16 inHg durante un tiempo total de tratamiento igual a 22 min. Bajo estas condiciones, se predijo un incremento en SS y FT de 41 y 9%, respectivamente, así como una retención de F del 97%. Al respecto, Los valores experimentales obtenidos en los ensayos de validación (a 16 inHg y 22 min) no mostraron diferencias significativas ($P > 0{,}05$) con los valores predichos por los modelos, para las respuestas usadas. Por lo tanto, se confirmó que los modelos desarrollados son adecuados para la descripción del proceso de IV variando la presión de vacío y el tiempo total de tratamiento.

Análisis sensorial

En la tabla 5, se presenta el promedio de las puntuaciones obtenidas, en el análisis sensorial descriptivo cuantitativo, para los octavos de naranja tanto frescos sin impregnar como los impregnados en el día 0 y el día 8.

Tabla 5. Atributos sensoriales de octavos de naranja frescos sin impregnar e impregnados en condiciones optimizadas (16 inHg y 22 min), día 0 y 8 del almacenamiento

Término descriptor	octavos frescos sin impregnar	octavos impregnados	
		Día 0	Día 8
Olor típico	6.4 ± 1.7^{a}	3.4 ± 1.5^{b}	3.2 ± 1.8^{b}
Olor miel	0.3 ± 0.2^{a}	6.6 ± 1.8^{b}	1.0 ± 0.6^{a}
Olor extraño	0.4 ± 0.5^{a}	0.3 ± 0.4^{a}	1.0 ± 0.8^{a}
Color típico	7.6 ± 0.6^{a}	7.7 ± 0.4^{a}	6.6 ± 0.6^{b}
Brillo	7.4 ± 0.5^{a}	7.7 ± 0.7^{a}	6.7 ± 1.1^{a}
Textura	6.2 ± 1.8^{a}	5.9 ± 1.9^{a}	5.6 ± 2.1^{a}
Jugosidad	7.6 ± 0.6^{a}	7.8 ± 0.8^{a}	6.5 ± 0.7^{a}
Dulzor	4.3 ± 0.9^{a}	6.6 ± 1.1^{b}	6.3 ± 1.2^{b}
Acidez	3.7 ± 1.2^{a}	2.8 ± 1.0^{a}	3.1 ± 0.9^{a}
Sabor típico	7.1 ± 1.1^{a}	5.2 ± 0.8^{b}	5.0 ± 1.4^{b}
Sabor miel	0.4 ± 0.5^{a}	5.9 ± 0.8^{b}	2.2 ± 1.5^{c}
Sabor extraño	0.2 ± 0.2^{a}	0.4 ± 0.4^{a}	0.8 ± 0.6^{a}

El ANOVA indicó que no había diferencia significativa en el brillo, textura, jugosidad y acidez entre los octavos de naranja impregnados y los octavos de naranja fresca sin impregnar, en el día 0 ni en el día 8. En el día 0, los octavos impregnados eran más dulce, con olor y sabor a miel, aunque con menor sabor y olor típico, no había diferencia en olor típico. Después del almacenamiento, el color típico disminuyó, igual que el olor y sabor a miel, estos últimos probablemente debido a la volatilidad de los compuestos característicos de la miel, mientras que el dulzor se mantuvo. Adicionalmente, no se generaron olores ni sabores extraños en el día 0 ni en el día 8 (por debajo del término ancla "ligeramente perceptible"). Los resultados en dulzor son congruentes con el incremento en sólidos solubles determinado instrumentalmente.

4. Conclusiones

La metodología RSM fue adecuada para modelar los cambios en la luminosidad, firmeza, sólidos solubles y fenoles totales al día 0, así como en vitamina C el día 8 de almacenamiento de octavos de naranja impregnados con solución de miel (50 °Brix), dentro del rango de presión (2-18 inHg) y tiempo ensayados (14-42 min).

No se pudieron modelar las demás respuestas ensayadas. Al respecto se observó que el día del tratamiento IV hubo un incremento leve en la cromaticidad y mantenimiento del tono del en los

octavos impregnados, así como un incremento en la vitamina C. Después del almacenamiento, la luminosidad incrementó, respecto al día del procesamiento, exhibiendo valores similares a los de los octavos frescos cortados. La cromaticidad y tonalidad también incrementaron indicando una intensificación en el tono amarillo y de la vivacidad del color. No ocurrieron cambios en el contenido de sólidos solubles, respecto al día del procesamiento, indicando la retención de los obtenidos en el tratamiento. La firmeza se incrementó por efecto de la deshidratación y también ocurrió un importante incremento en fenoles totales.

El procedimiento de optimización con respuestas múltiples, permitió encontrar las condiciones de proceso óptimas para los octavos de naranjas. Los ensayos de validación, realizados bajo estas condiciones mostraron acuerdo entre los valores experimentales obtenidos y los predichos por los modelos para las respuestas estudiadas.

De acuerdo con el ADC, los octavos de naranja impregnados, eran más dulces, con olor y sabor a miel en comparación con los octavos sin impregnar. Además, mantenían la textura, jugosidad y el color típico del fruto fresco cortado. Después del almacenamiento refrigerado, los octavos impregnados mantenían el brillo, textura, jugosidad y dulzor similar al día del tratamiento de IV. El color típico, olor y sabor a miel disminuyeron. El olor y sabor típico (característico de fruta cítrica) disminuyeron después de la IV con miel, sin cambios durante el almacenamiento, probablemente porque fue reemplazado por el olor y sabor de esta. No se generó olor ni sabor extraño en los octavos impregnados el día 0 ni el día 8.

Los resultados obtenidos demostraron que es posible obtener un producto mínimamente procesado con agregado de miel mediante la tecnología de IV que tiene un gran potencial para la comercialización de un producto diferenciado. Se obtuvo naranjas mínimamente procesadas con características de color y textura similares o mejores que el fruto fresco, con mayor contenido en sólidos solubles y sin pérdidas considerables en el potencial bioactivo. Además, después de 8 días de almacenamiento refrigerado tenían buena retención del contenido vitamínico, incluso un leve incremento en los compuestos fenólicos.

5. Referencias

Agostini, J. D. S., Scalon, S. D. P. Q., Silva, K. E. D., Lima, F. F. D., Gomes, A. P. E., Leite, M. M. (2013). Physicochemical and microbiological characteristics of minimally processed' Champagne' oranges (Citrus reticulata× Citrus sinensis) in different packgings. Food Science and Technology, 33(1), 84-92. doi.org/10.1590/S0101-20612013005000018

Barrios, S., De Aceredo, A., Chao, G., De Armas, V., Ares, G., Martín. y otros dos autores (2014). Passive modified atmosphere packaging extends shelf life of enzymatically and vacuum-peeled ready-to-eat valencia orange segments. Journal of Food Quality, 37(2), 135-147. https://doi.org/10.1111/jfq.12074

Cajka, T., Hajslova, J., Pudil, F., Riddellova, K. (2009). Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks. Journal of Chromatography A, 1216(9), 1458-1462. https://doi.org/10.1016/j.chroma.-2008.12.066

Cháfer, M., Perez, S., Vargas, M., Chiralt, A. (2008). Stability and quality of minimally processed orange slices. Journal of food processing and preservation, 32(2), 319-334. doi.org/10.1111/j.1745-4549. 2008.00181.x

Contreras-Oliva, A., Pérez-Gago, M. B., Salvador, A., Bermejo, A., Rojas-Argudo, C. (2012). Calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de naranjas CV. Valencia recubiertas con quitosano. Agrociencia, 46(5), 441-453.

Cortez, J. D., Faicán, M. A., Pirovani, M. E., Piagentini, A. M. (2018). Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 19(2). http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541002

Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. Journal of quality technology, 12(4), 214-219. https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968

Francis, G. A., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., Amodio, M. L., Spano, G. (2012). Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. Critical reviews in food science and nutrition, 52(7), 595-610. DOI: 10.1080/10408398.2010.503685

Hough, G., Witting, E. (2005). Introducción al análisis sensorial. In: Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. Hough, G. y Fiszman S. (Ed). pp: 13-16. CYTED. Madrid, España.

Karacay, E., Ayhan, Z. (2010). Microbial, physical, chemical and sensory qualities of minimally processed and modified atmosphere packaged "ready to eat" orange segments. International Journal of Food Properties, 13(5), 960-971.

Maran, J. P., Manikandan, S. (2012). Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (Opuntia ficus-indica) fruit. Dyes and Pigments, 95(3), 465-472. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.06.007

Piagentini, A. M., Pirovani, M. E. (2017). Total phenolics content, antioxidant capacity, physicochemical attributes, and browning susceptibility of different apple cultivars for minimal processing. International Journal of Fruit Science, 17(1), 102-116.

Pirovani, M., Piagentini, A.M., Van de Velde, F. (2015). Chapter 2: Bioactive compounds in fresh-cut fruits: occurrence and impact of processing and cold storage. In: Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications in Foods and Pharmaceuticals. Edited by Vijai Kumar Gupta, Maria G. Tuohy, Anthonia O'Donovan and Mohtashim Lohani. John Wiley y Sons-(Reino Unido). ISBN: 9781118733493, 37-62, pp 736.

Plaza, L., Crespo, I., de Pascual-Teresa, S., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Muñoz, M., Cano, M. P. (2011). Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage. Food Chemistry, 124(2), 646-651. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.089

Rapisarda, P., Bianco, M. L., Pannuzzo, P., Timpanaro, N. (2008). Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. Postharvest biology and technology, 49(3), 348-354. https://doi.org/10.1016/j.-postharvbio.2008.02.002

Rößle, C., Brunton, N., Gormley, T. R., Butler, F. (2011). Quality and antioxidant capacity of fresh-cut apple wedges enriched with honey by vacuum impregnation. International journal of food science & technology, 46(3), 626-634.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.

Van de Velde, F., Güemes, D. R., Pirovani, M. É. (2014). Optimization of the peracetic acid washing disinfection of fresh-cut strawberries based on microbial load reduction and bioactive compounds retention. International Journal of Food Science and Technology, 49, 634–640. https://doi.org/10.1111/ijfs.12346

Van de Velde, F., Pirovani, M. E., Cámara, M. S., Güemes, D. R., Bernardi, C. M. D. H. (2012). Optimization and Validation of a UV-HPLC Method for Vitamin C Determination in Strawberries (Fragaria ananassa Duch.), Using Experimental Designs. Food Analytical Methods, 5, 1097–1104. https://doi.org/10.1007/s12161-011-9347-5

Verma, V. C. (2017). Vacuum impregnation: Emerging technology for osmotic dehydration and value addition in fruits and vegetables products. Journal of Postharvest Technology, 5(4), 01-09. http://jpht.info/index.php/jpht/article/viewFile/20357/9890

Zhao, Y., Xie, J. (2004). Practical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. Trends in food science y technology, 15(9), 434-451. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.01.008

Jeon, M., Zhao, Y. (2005). Honey in combination with vacuum impregnation to prevent enzymatic browning of fresh-cut apples. International journal of food sciences and nutrition, 56(3), 165-176.

27TCA - Nuevas fuentes de biopolímeros y su potencial aplicación en la industria alimentaria

New sources of biopolymers and their potential application in the food industry

Luis Mieles-Gomez[1*], Santander Lastra-Ripoll[1], Edilbert Torregroza-Fuentes[2], Somaris E. Quintana[1], Luis A. García-Zapateiro[1*]

1. Grupo de Investigación en Ingeniería de Fluidos Complejos y Reología de Alimentos, Universidad de Cartagena, Cartagena, 130015, Colombia.
2. Grupo de Investigación Ciencia, Tecnología y Sociedad – CTS, Universidad de Cartagena, 130015, Colombia. E-mail: lmielesg@unicartagena.edu.co ; lgarciaz@unicartagena.edu.co

Resumen

Los biopolímeros son sistemas moleculares de cadena larga que se han empleado como aditivos en la industria alimentaria debido a sus propiedades tecno-funcionales. En el presente trabajo se ha realizado la obtención y caracterización de biopolímeros (hidrocoloides y almidones) de diferentes matrices alimentarias y la evaluación de su potencial aplicación en el desarrollo de productos micro-estructrudados. Los hidrocoloides fueron obtenidos de la pulpa y semilla de ahuyama (*Cucurbita moschata*); mientas que los almidones se obtuvieron a partir de la semilla de mango (*Mangifera indica*) var fachir. El estudio reológico permitió identificar que los biopolímeros presentaron un comportamiento de fluido no newtoniano tipo fluidificante "*shear thinning*"; además, mostraron un comportamiento más elástico que viscoso, con un módulo de almacenamiento superior al módulo de perdidas (G' < G'') en el rango de frecuencia evaluado, donde los hidrocoloides de semilla de ahuyama presentaron características de gel fuerte, relacionado con su contenido de proteínas y carbohidratos. Luego, el desarrollo de biopolímeros de fuentes naturales contribuye a la transformación y uso agroindustrial de las plantas vegetales de potencial uso como agentes gelificantes, espesantes, emulsificantes y/o estabilizantes, que mejoren la retención de agua y las propiedades de textura de productos alimentarios.

Palabras clave: Hidrocoloides, almidón, reología, bromatológico

Abstract

Biopolymers are long-chain molecular systems that have been used as additives in the food industry due to their techno-functional properties. In the present work, biopolymers (hydrocolloids and starches) from different plants were obtained and characterized, and their potential application in the development of micro-structured products was evaluated. The hydrocolloids were obtained from the pulp and seed of pumpkin (*Cucurbita moschata*); while the starches were obtained from the seed of mango (*Mangifera indica*). The rheological study allowed obtaining systems with non-Newtonian flow behavior for all the samples, where the biopolymers presented pseudoplastic fluid characteristics. The samples showed a more elastic than viscous behavior, with a storage modulus higher than the loss modulus (G' < G'') in the frequency range evaluated, where the passion fruit seed hydrocolloids presented strong gel characteristics, related to their protein and carbohydrate content. Therefore, the development of biopolymers from natural sources contributes to the transformation and agroindustrial use of vegetable plants of potential use as gelling agents, thickeners, emulsifiers, and/or stabilizers, which improve water retention and textural properties of food products.

Keywords: Hydrocolloids, starch, rheology, bromatological.

1. Introducción

Los biopolímeros son sistemas moleculares de cadena larga que se han empleado en la industria alimentaria como aditivos e ingredientes. (Clark & Ross-Murphy, 2009). Los biopolímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), origen marino (quitina/quitosan), origen agrícola (lípidos, grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) y origen microbiano (ácido poliláctico y polihidroxialcanoatos) (Tharanathan, 2003).

Los biopolímeros tienen diferentes aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética; por ejemplo, en la encapsulación de agentes, modificadores de textura y agentes miméticos de grasa.

Los biopolímeros de uso alimentarios tienen diferentes habilidades para la formación de emulsiones, debido a las diferencias en sus estructuras moleculares que afectan las características de adsorción de la superficie durante la homogenización y su habilidad para estabilizar las gotas formadas; también, pueden ser dirigidos a la formación de diferentes texturas en alimentos: alterando la concentración de los polímeros, modificando las condiciones de procesamiento como el pH o la fuerza iónica, y también usando mezclas de polímeros en concentraciones donde se formen sistemas individuales o de dos fases (Çakır & Foegeding, 2011). Además, su consumo puede tener beneficios a la salud debido a la presencia de polisacáridos, por lo que hay un creciente interés en el desarrollo de diversos tipos de biopolímeros para aplicaciones comerciales.

Los hidrocoloides naturales, como las macromoléculas biológicas, se utilizan ampliamente en productos alimenticios ya que tienen beneficios especiales en comparación con los hidrocoloides sintéticos y semisintéticos, como ser biocompatibles, renovables, no tóxicos, estables, biodegradables, ecológicos, rentables, fácilmente accesible y susceptible de ser modificado químicamente. Por ello, en los últimos años se ha incrementado e la búsqueda y caracterización de nuevos hidrocoloides a partir de recursos naturales. Estos son sustancias altamente hidrofílicas que son solubles o dispersas en agua , incrementando la viscosidad de los sistemas; desde el punto de vista químicos son polisacáridos o proteínas (J.-M. Li & Nie, 2016), que proveen propiedades funcionales que pueden ser usadas en la industria alimentaria como agentes gelificantes, espesantes, emulsificantes, estabilizantes, que contribuyen en la formación de espumas, inhibidores de sinéresis en procesos de congelación y de descongelación, mejora la retención de agua y las propiedades de texturas (Çakır & Foegeding, 2011). Ejemplos de estos incluyen agar, alginatos, kappa-iota carragenina, curdlan, metilcelulosa, hidroxipropymetilcelulosa, goma guar, xanthana y de algarobo. Todos presentan propiedades reológicas diferentes, condicionando su uso para el desarrollo de productos, por ejemplo: el alginato de sodio es un agente espesante de sistemas acuosos y no puede formar geles sino tiene iones de calcio o de hidrógenos añadidos; las soluciones de goma xantana o de algarrobo por sí sola no forman geles, sin embargo, la combinación de estas sí; y soluciones de metilcelulosa y hidroxipropymetilcelulosa debe ser calentada para formar geles reversibles. Aunque la formación de geles para todas las gomas depende de la concentración utilizada, los sistemas acuosos a los que se les ha incrementado la viscosidad con hidrocoloides exhiben diferentes comportamientos reológicos (BeMiller, 2008).

El almidón es un polímero semicristalino que consiste en amilosa de cadena lineal con subunidades - (1,4) -D-glucopiranosa y amilopectina en una red similar grande como amilosa, pero tiene muchas ramificaciones a través de - (1,6) -D red de glucopiranosa (Trommsdorff & Tomka, 2002). El almidón puro es usualmente blanco, inoloro, insípido e insoluble en agua fría y solventes orgánicos (Schmiele, Sampaio, & Pedrosa Silva Clerici, 2019). El almidón es versátil, de bajo costo y tiene muchos usos, incluso como espesante, aglutinante de agua, estabilizador de emulsión y agente gelificante (Agudelo et al., 2014; Farris, 1984). También es un ingrediente importante en las industrias del papel, plástico, adhesivo, textil, confitería, bebidas, farmacéutica, biomédica y biotecnológica(Alinnor & Akalezi, 2010; Nand et al., 2008).

Con base a lo anterior en el presente trabajo se ha planteado como objetivo la obtención de biopolímeros de fuentes alternativas a las tradicionales, realizando la obtención de hidrocoloides a partir de la pulpa y semilla de ahuyama (*Cucurbita moschata*) y almidón a partir de la semilla de mango (*Mangifera indica*), y su caracterización bromatológica y reológica, así como su potencial aplicación como ingrediente o aditivo en la industria de alimentos.

2. Materiales y métodos

a. Materiales

La ahuyama (*Cucurbita moschata*) y mango (*Mangifera indica*) var fachir se cosecharon en su madurez comercial en el municipio de Santa

Catalina, Departamento de Bolívar (Colombia) y se transportaron al laboratorio de Ingeniería de Fluidos Complejos y Reología de Alimentos (IFCRA) de la Universidad de Cartagena (Cartagena de Indias, Colombia). Se realizó un lavado para limpiar ambas frutas con agua e hipoclorito de sodio (100 ppm); luego, la cáscara, la semilla y la pulpa se separaron manualmente.

Se adquirió etanol (99,5% de pureza) de Panreac (Barcelona, España), hidróxido de sodio (NaOH, grado analítico), éter de petróleo (grado analítico), bisulfito de sodio ($NaHSO_3$) y soluciones tampón (ácido bórico / cloruro de potasio / hidróxido de sodio) de Merck Millipore (Múnich, Alemania).

b. Preparación de las muestras

Para el caso de la semilla de ahuyama (*Cucurbita moschata*), se procedió al lavado con agua a temperatura ambiente y secado al sol durante 3 días. Posteriormente las semillas fueron cortadas y se separó manualmente la cascara y el núcleo o centro, el núcleo de la semilla se sometió a una reducción de tamaño de partícula a través de molienda. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C para su posterior uso.

Para la pulpa de ahuyama (*Cucurbita moschata*) se procedió a reducir el tamaño de partícula, empacar a vacío y almacenar en congelación para su posterior uso.

Para la semilla de mango (*Mangifera indica*) var fachir, se lavaron para eliminar cualquier resto de pulpa adherida, luego se secaron a 40 °C durante 4 h en un secador de bandeja para facilitar la separación del *kernel* o nucleo; luego, el *kernel* se separó de la cáscara, se cortó y se secó en un secador de bandeja de aire caliente a 40 ° durante 12 h y se molió (Molino IKA MF 10.1-Cabezal de corte Alemania) para obtener la harina con tamaño de partícula inferior a 200 μm.

c. Obtención de hidrocoloides

La extracción de hidrocoloides se realizó mediante los métodos descritos por Orgulloso-Bautista et al., (2021) y Quintana Martínez et al., (2021) con algunas modificaciones. Para esto, se realizó una extracción sólido-líquido se con materia prima: agua destilada en una relación 1:10, durante 4 h a 80 ºC, en condiciones de acidez. La mezcla resultante se centrifugó a 6500 rpm durante 15 min logrando la separación del sobrenadante. Posteriormente, la solución viscosa se mezcló con etanol en una proporción de 1: 1 a 4 ºC para precipitar el extracto a base de hidrocoloide. La mezcla se centrifugó y el precipitado se recogió y se liofilizó durante 48 h.

d. Obtención de almidones

El almidón de semilla de mango se aisló utilizando un método descrito por Mieles-Gómez et al., (2021) con algunas modificaciones. La harina se suspendió en una solución de bisulfito de sodio al 1% (proporción 1:10 p/v) y se sometió a agitación magnética durante 4 ha temperatura ambiente. La mezcla se homogeneizó en un ultra-turrax (T20 digital Ultra-Turrax), luego se filtró a través de una malla 100, después de lo cual el residuo se lavó a fondo con agua destilada. Se dejó el filtrado durante 30 min y se decantó el sobrenadante; el residuo de almidón se re-suspendió en agua destilada y luego se centrifugó a 3000 x g durante 10 min para precipitar el almidón. El almidón de semilla de mango se secó en un secador de bandeja de aire caliente a 40 °C durante 12 h.

Los rendimientos (%Y) de obtención de biopolímeros se determino siguiendo la ecuación (1):

$$\%Y = \frac{g\ de\ biopolimero}{g\ semilla\ o\ pulpa} \times 100 \qquad (1)$$

e. Caracterización proximal y química

La composición proximal, para todas las muestras fueron determinada por triplicado siguiendo los métodos descritos por la AOAC. *Association of Official Analytical Chemist,* (2000).

El contenido de humedad y materia seca por el método AOAC 934.01, el contenido de cenizas se determinó gravimétricamente por incineración de 1 g de muestra en un horno a 900 °C durante 2 h. El contenido de proteínas se determinó usando el método Kjeldahl, el extracto etéreo por soxhlet y carbohidratos por diferencia.

El contenido de amilosa se determinó utilizando el método colorimétrico de Morrison y Laignelet (1983); las lecturas se tomaron a 620 nm en un espectrofotómetro calibrado, que también se utilizó para producir una curva estándar a partir de soluciones de amilosa pura (Sigma potato amylose), con concentraciones que van de 8 a 60 g/100 g.

f. Caracterización reológica

Se realizaron ensayos reológicos en estado estacionario y oscilatorio con el objetivo de identificar las propiedades de flujo y

viscoelásticas de los biopolímeros obtenidos empleando un sistema de reómetro avanzado modular Haake Mars 60 (Thermo-Scientific, Karlsruhe Alemania).

Curva en estado estacionario
La prueba en estado estacionario se realizó a una temperatura de 25 °C, sobre una velocidad de cizallamiento en el rango de 10^{-3} a 10^{3} s^{-1}.

Barrido de esfuerzo
La prueba de barrido de esfuerzo se realizó dentro del rango de 0.01 a 1000 Pa y con frecuencia angular de 0.1 Hz en todas las muestras, con el fin de determinar el régimen viscoelástico lineal (LVR).

Barrido de frecuencia
Con base en los resultados de estos experimentos, el barrido de frecuencia se realizó a 0.1 Pa, para mantener la tensión en el LVR, dentro del rango de 0.01 a 100 rad · s^{-1}.

g. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media ± error estándar y el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.

3. Resultados y Discusión

El rendimiento de la extracción y la composición proximal de los hidrocoloides obtenidos de la pulpa y semilla de ahuyama (*Cucurbita moschata*) se muestran en la Tabla 1.

Las técnicas de extracción convencionales generalmente emplean medios termomecánicos para producir el producto deseado en el que se requieren temperaturas elevadas y procesos de calentamiento prolongados para obtener rendimientos de extracción relativamente mayores (Moseley & Kappe, 2011).

Los hidrocoloides de pulpa y semilla de ahuyama presentaron rendimientos de 1,25 ± 0,02 y 4,68 ±0,12, respectivamente. Valores muy bajos si se comparan con distintos hidrocoloides extraídos de subproductos de la industria frutícola (Quintero-Valbuena, 2016). Estos valores bajos se deben a la composición química de la pulpa, que en su mayor parte está compuesta por agua (85,34 ± 0,26 %) y la semilla por grasa (52,6 ± 0,01 %) (Quintana et al., 2018). Ahora bien, con la obtención de los hidrocoloides se logro la extracción de un alto contenido de carbohidrato para cada una de las muestras con valores de 60,44 ±0,48 y 50,80 ±1,10 para los hidrocoloides de pulpa y semilla de ahuyama respectivamente.

El almidón de semilla de mango presentó rendimientos de extracción de 59,51 ± 1,35 %, resultado similar a almidones de semilla de mango de origen indio (60,12 ± 0,53%) (Bharti et al., 2019). Los valores de humedad y grasa son inferiores a los reportados de almidones aislados de cereales y tubérculos (Baldwin, 2001; Punia et al., 2021), lo que reduce la probabilidad de rancidez.

El contenido de amilosa, grasa y cenizas son importantes en las características estructurales y funcionales del almidón, afectando algunas propiedades particularmente útiles en la industria alimentaria, como la gelatinización, solubilidad, características aglutinantes y textura. En este caso, el contenido de amilosa fue 27,28 ± 0,05%. Por lo tanto, se puede clasificar como almidón normal (amilosa entre 20- 35 %) y son similares a valores de amilosa de almidones convencionales tales como, batata, ñame, maíz, yuca y papa (19,6 - 28,3%)(Hernández-Medina et al., 2008). El contenido de amilosa es primordial para originar almidones resistentes ya que los almidones con alto contenido de amilosa tienen mayor capacidad de retrogradación, y, por tanto, la mayor formación de almidones resistentes (geles más resistentes). Esto indica que la eficiencia del proceso de extracción del almidón se acerca al 100% y que los restos de otros nutrientes están incrustados dentro de la matriz de almidón.

Tabla 1. Rendimientos de extracción y composición proximal de biopolímeros

Muestras	Y %	Humedad	Ceniza	Proteína	Grasa	Carbohidrato
Hidrocoloide de pulpa de ahuyama	1,25 ±0,02	30,93 ±0,92	10,78 ±0,23	0,28 ±0,74	0,81 ±0,07	60,44 ±0,48
Hidrocoloide de semilla de ahuyama	4,68 ±0,12	4,426 ±0,56	16,1 ±0,84	29,43 ±0,17	2,96 ±1,25	50,80 ±1,10
Almidón de semilla de mango	59,51 ±1,35	8,21 ±1,54	59,51 ±1,35	--	0,34 ±0,07	--

a. Propiedades reológicas

La caracterización reológica de las muestras se evidencia en las Figuras 1 y 2.

Como se puede observar en la Figura 1, la viscosidad de los hidrocoloides obtenidos de pulpa y semilla de ahuyama y almidón de semilla de mango disminuyó al aumentar la velocidad de

deformación, característica típica de fluidos no-Newtoniano tipo fluidificante (*Shear-thinning*) (Macosko, 1994). Este comportamiento puede ser explicado por una ruptura de las moléculas de polisacáridos en el hidrocoloide durante el cizallamiento, de modo que sucede una alineación de sus cadenas a lo largo de la dirección del flujo, dando como resultado una reducción exponencial de la viscosidad (Hyun et al., 2011).

En el caso de los almidones, el contenido de amilosa juega un papel importante en el comportamiento de los flujos viscosos de los geles de almidón, ya que, podría enredarse con sus moléculas cercanas, como otras amilosa o amilopectina. Este entrelazamiento también podría atrapar partículas grandes como el remanente de los gránulos de almidón después de la gelatinización. Cuando se someten a velocidades de deformación, las moléculas entrelazadas se reorientan en la dirección de cizallamiento provocando una disminución de la viscosidad (G. Li & Zhu, 2018). Resultados similares se han encontrado en dispersiones de hidrocoloides y almidones de nuevas fuentes, tales como hidrocoloides de semillas de albahaca y almendros y almidón de amaranto (Abbasi, 2017; Kong et al., 2010; Razavi & Naji-Tabasi, 2017).

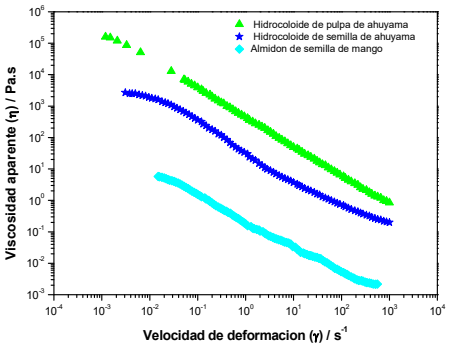


Figura 1. Curva de flujo viscoso en estado estacionario de biopolímeros a 25 ºC.

Se pueden emplear distintos modelos que permiten ajustar los datos experimentales de viscosidad frente a la velocidad de deformación, los datos experimentales de los hidrocoloides se ajustaron al modelo de Carreau-Yasuda (Ecuación 2) (Carreau, 1972).

$$\eta = \eta_o + (\eta_o + \eta_\infty)[1 + (\lambda_C \dot{\gamma})^a]^{n-1/a} \qquad (2)$$

Este modelo describe el flujo de fluidos no newtonianos dependientes del tiempo, con viscosidades de cizallamiento cero η_0 e infinito η_∞. El parámetro de relajación de tiempo λc es una constante de tiempo de Carreau, donde 1/λc es la velocidad de cizallamiento crítica a la que la viscosidad comienza a disminuir. El valor n corresponde al parámetro del modelo de ley de potencias; cuando n = 1, el modelo se reduce al modelo newtoniano lineal. Para líquidos fluidificantes, n <1, la viscosidad disminuye con el aumento de la velocidad de deformación. El parámetro a es adimensional, a veces llamado constante de Yasuda, que describe la región de transición entre η_0 y la caída de potencial (Khan et al., 2020).

Los hidrocoloies, presentaros valores del coeficiente de correlación (R^2) superiores 0.991, lo que indica un buen ajuste de los datos experimentales. Ambos hidrocoloides presentaron valores de índice de comportamiento de flujo (n) menores a 1 (0.05 - 0.13 para los hidrocoloides de pulpa y semilla respectivamente), lo que confirma su comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento, que es un comportamiento típico en dispersiones de hidrocoloides (Krstonošić et al., 2021).

Los hidrocoloides presentaron valores de viscosidad aparente altas que variaron entre 0.001-0.12 MPa·s, superiores a los reportados para hidrocoloide de semilla de acacia tres espinas (Gleditsia triacanthos L.)(Martinez-Vasquez, 2007), estos valores indican la viscosidad de las dispersiones de hidrocoloides en situaciones de reposo o movimiento lento, proyectando su potencial uso como estabilizantes en el desarrollo de productos alimentarios.

Los datos experimentales del almidón de semilla de mango se ajustaron al modelo de Ostwald de Waele o Ley de la Potencia (Ecuación 3); este, describe el comportamiento del flujo de la mayoría de alimentos en la práctica usando la velocidad de deformación de 0.001 y 1000 s^{-1}(Rao & Steffe, 1992).

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1} \qquad (3)$$

Donde η es la viscosidad aparente (Pa·s), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), K es el coeficiente de consistencia (Pa·s^n) y n es el índice de flujo (Adimensional).

El valor de K de la muestra fue de 254 y el de n de 0.08, es decir, inferior a 1, lo que confirma la naturaleza de adelgazamiento por cizallamiento de la pasta de almidón. Los valores de coeficiente

de correlación para el ajuste del modelo fue de R^2 = 0.985, lo que indica un buen ajuste de los datos experimentales.

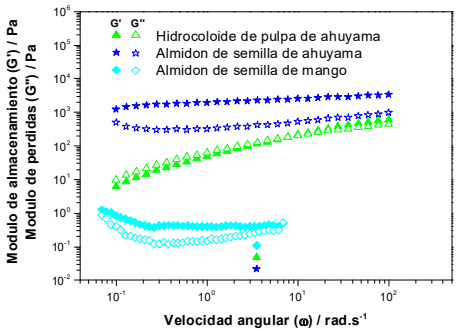


Figura 2. Módulo de perdida (G') y módulo de almacenamiento (G'') de biopolímeros a 25 ºC.

La Figura 2 muestra los perfiles de las dispersiones de hidrocoloides y almidón en términos de G' y G" en función de la frecuencia angular (rad·s^{-1}) a 25 ºC. En el espectro mecánico de la frecuencia estudiado se observa una solución tipo gel por una red de macromoléculas enredadas, puesto que, a excepción del hidrocoloide obtenido de la pulpa de ahuyama, se observó que el módulo de almacenamiento G' es mayor que G'' dentro del rango de frecuencia analizada. Esto indica que los hidrocoloides presentaron un comportamiento principalmente elástico, debido a su alta viscosidad, a causa que este comportamiento se encuentra influenciado por la organización y estructura de los polímeros (Quintana et al., 2016); comportamientos parecidos fueron observados para la goma de semilla de albahaca y los hidrocoloides obtenidos de las semillas de *Ocimum basilicum* (Keisandokht et al., 2018).

Los resultados del barrido de frecuencia en el almidón sugieren que el carácter de gel domina en todo el rango de frecuencia principalmente debido a que se ha informado que las moléculas de almidón, especialmente la amilosa, tienden a volver a formar hélices dobles, lo que resulta en un gel más duro y una G' más alta que G" (G. Li & Zhu, 2018).

El análisis viscoelástico brinda información sobre la dependencia de la frecuencia o el tiempo y el comportamiento estructural de los componentes. En el caso de la tangente de ángulo de fase (tan δ = G''/G'), es una medida adimensional que compara la cantidad de energía perdida durante un ensayo oscilatorio con la cantidad de energía almacenada durante este periodo, e indica si predomina la propiedad elástica o viscosa (Mota & Ibarz, 2006). En el hidrocoloide de semilla de ahuyama y en el almidón de semilla de mango presentan valores de δ < 1, lo que confirma que G' siempre fue mayor que G'' presentando un dominio claro de las propiedades elásticas sobre las viscosas, tal como se había evidencia en la Figura 2.

Los resultados obtenidos de los diferentes biopolímeros son importantes para predecir el comportamiento del aditivo a través de la manipulación de alimentos. En general, las características reológicas de los hidrocoloides y almidones y su capacidad para estabilizar la textura de las formulaciones alimentarias son puntos importantes que influyen en la selección del hidrocoloide para aplicaciones especiales. Además, para interactuar con otros hidrocoloides y proteínas desde el punto de vista reológico.

b. Potencial uso de los biopolímeros en la industria de alimentos

Durante los últimos años, los científicos han aumentado sus investigaciones al estudio de biopolímeros nuevos y de fuentes naturales a causa de la creciente demanda en las industrias alimentaria y farmacéutica de aditivos de fuentes naturales seguras, de bajo costo, fácil acceso, sostenibles, biodegradables y ecológicamente amigable como reemplazo parcial y/o total de gomas naturales y sintéticas ya que normalmente son costosas (goma de tragacanto), insostenibles (goma arábiga) y en algunas casos toxicas (McClements, 2021). Además, la obtención de biopolímeros a partir de desechos y subproductos pueden representar ventajas tecnológicas sobre los hidrocoloides y/o almidones convencionales (Zhu, 2020).

Los hidrocoloides y almidones de nuevas fuentes naturales pueden utilizarse como ingredientes funcionales, tales como agente gelificante, espesante, emulsionantes o estabilizantes para la formulación de una nueva generación de productos alimentarios funcionales. Los hidrocoloides obtenidos de la epidermis de la ahuyama (*Cucurbita moschata*) se ha utilizado como reemplazo parcial de pectina en un producto micro-estructurado como una mermelada de papaya (*Carica papaya*) (Quintana Martínez et al., 2021) y como reemplazo total y parcial de goma xantan en un producto tipo emulsión aceite en agua como la mayonesa (Orgulloso-Bautista et al., 2021). El hidrocoloide de epidermis de ahuyama mostró un efecto positivo en la matriz de la mermelada teniendo función como espesante, gelificante y estabilizante, dando lugar

a un producto sin sinéresis y presentando un mayor modulo elástico, también se diseñaron salsas estables tipo mayonesa usando hidrocoloide de cascara de ahuyama total y parcial como aditivo, reduciendo el uso y contenido de gomas comerciales como goma xantana.

Asimismo, se ha evaluado el efecto de los hidrocoloides de las semillas de ahuyama como estabilizadores sobre las propiedades fisicoquímicas, reológicas y sensoriales de un yogur natural, la adición de este hidrocoloide fue una alternativa para aumentar la viscosidad o el grosor de los productos alimenticios y mejorar la capacidad de retención de agua y la textura del yogur, además contribuyó al aumento de las características generales deseables que representaron mayor aceptación sensorial (Rojas-Torres et al., 2021).

De igual forma, pueden ser utilizados para crear sistemas de administración coloidal que son estructuras complejas en los alimentos que alteran el comportamiento de ciertos nutrientes como algunos compuestos bioactivos. El almidón de semilla de mango se ha utilizado en mezcla con carboximetilcelulosa para estabilizar geles de emulsión con la adición de extractos de cascara de mango (Mieles-Gómez et al., 2021). Los resultados de esta investigación ofrecen una alternativa a la elaboración de un nuevo sistema alimentario multifuncional con propiedades bioactivas con potencial aplicación como reemplazo o sistema de entrega de grasas en la industria alimentaria.

Los almidones de semilla de mango se han utilizado en varios campos, como aditivo espesante en sopa y bebidas lácteas (Silva et al., 2013; Yatnatti & Vijayalakshmi, 2018). Igualmente, e la formulación de películas/recubrimientos novedosos a base de almidones con características funcionales novedosas para mejorar la vida útil de productos frescos. Los recubrimientos comestibles de almidones mejoraron la vida útil de frutos de mango variedad “Palmer” y “Ataulfo”, almendras, tomates y chiles rojos, presentando buenas propiedades de barrera que reducen la frecuencia respiratoria y la pérdida de peso en función del tiempo de almacenamiento (Nawab et al., 2018; Nawab et al., 2016; Rodrigues et al., 2020).

Los biopolímeros como hidrocoloides y almidones de nuevas fuentes naturales son ingredientes versátiles que se pueden utilizar en la formulación de diferentes productos alimenticios para aprovechar sus ventajas tecno-funcionales.

4. Conclusiones

El desarrollo de biopolímeros de fuentes naturales contribuye a la transformación y uso agroindustrial de las plantas vegetales de potencial uso como agentes gelificantes, espesantes, emulsificantes y/o estabilizantes, que mejoren la retención de agua y las propiedades de textura de productos alimentarios.

Los hidrocoloides obtenidos de la semilla y pulpa de ahuyama (*Cucurbita moschata*) pueden considerarse una buena fuente para su uso como ingrediente en el diseño de productos alimenticios, mejorando la estabilidad y funcionalidad que demanda el consumidor en el mundo actual. Por el perfil químico y reológico, el almidón de semilla de mango es una de las fuentes no convencionales para una aplicación industrial. Tiene el potencial para usarse como ingrediente funcional en alimentos y como recubrimientos y películas comestibles, se sugiere que este almidón puede competir y reemplazar almidones comercialmente utilizados.

5. Referencias

Agudelo, A., Varela, P., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2014). Native tapioca starch as a potential thickener for fruit fillings. Evaluation of mixed models containing low-methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, *35*, 297–304. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.06.004

Alinnor, I. J., & Akalezi, C. O. (2010). Proximate and mineral compositions of *Dioscorea rotundata* (white yam) and Colocasia esculenta (white cocoyam). *Pakistan Journal of Nutrition*, *9*(10), 998–1001. https://doi.org/10.3923/PJN.2010.998.1001

Arendt, E., & Bello, F. D. (2008). Gluten-Free Cereal Products and Beverages. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373739-7.X5001-1

Ashri, A., Yusof, M. S. M., Jamil, M. S., Abdullah, A., Yusoff, S. F. M., Arip, M. N. M., & Lazim, A. M. (2014). Physicochemical characterization of starch extracted from malaysian wild yam (*Dioscorea hispida* dennst.). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *26*(8), 652–658. https://doi.org/10.9755/EJFA.V26I8.17098

Brautlecht, C. A. (1941). Starch and Its Derivatives (Radley, J. A.). *Journal of Chemical Education*, *18*(10), 499. https://doi.org/10.1021/ED018P499.1

Çakir, E., & Foegeding, E. A. (2011). Combining protein micro-phase separation and protein–polysaccharide segregative phase separation to produce gel structures. *Food Hydrocolloids*,

25(6), 1538–1546. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.02.002

El, S. N., & Simsek, S. (2012). Food Technological Applications for Optimal Nutrition: An Overview of Opportunities for the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*(1), 2–12. https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2011.00167.X

Kasapis, S., Norton, I. T., & Ubbink, J. B. (2009). Modern Biopolymer Science. *Modern Biopolymer Science*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.X0001-8

Lastra-Ripoll, S. E., Quintana-Martinez, S. E., & Garcia-Zapateiro, L. A. (2021). Rheological and Microstructural Properties of Xanthan Gum-Based Coating Solutions Enriched with Phenolic Mango (*Mangifera indica*) Peel Extracts. *ACS Omega*. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02011

Mieles-Gómez, L., Lastra-Ripoll, S. E., Torregroza-Fuentes, E., Quintana, S. E., & García-Zapateiro, L. A. (2021). Rheological and Microstructural Properties of Oil-in-Water Emulsion Gels Containing Natural Plant Extracts Stabilized with Carboxymethyl Cellulose/Mango (*Mangifera indica*) Starch. *Fluids 2021, Vol. 6, Page 312*, *6*(9), 312. https://doi.org/10.3390/FLUIDS6090312

Nand, A. v, Charan, R. P., Rohindra, D., & Khurma, J. R. (n.d.). *Isolation and properties of starch from some local cultivars of cassava and taro in Fiji*. https://doi.org/10.1071/SP08007

Orgulloso-Bautista, S., Ortega-Toro, R., Alberto, L., & Zapateiro, G. (2021). Design and Application of Hydrocolloids from Butternut Squash (*Cucurbita moschata*) Epidermis as a Food Additive in Mayonnaise-type Sauces. *ACS Omega*. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05852

Quintana Martínez, S. E., Torregroza Fuentes, E. E., & García Zapateiro, L. A. (2021). Food Hydrocolloids from Butternut Squash (*Cucurbita moschata*) Peel: Rheological Properties and Their Use in *Carica papaya* Jam. *ACS Omega*, acsomega.1c00822. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00822

Rojas-Torres, S. A., Quintana, S. E., & García-Zapateiro, L. A. (2021). Natural Yogurt Stabilized with Hydrocolloids from Butternut Squash (*Cucurbita moschata*) Seeds: Effect on Physicochemical, Rheological Properties and Sensory Perception. *Fluids 2021, Vol. 6, Page 251*, *6*(7), 251. https://doi.org/10.3390/FLUIDS6070251

Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 71–78). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7

Trommsdorff, U., & Tomka, I. (2002). Structure of Amorphous Starch. 1. An Atomistic Model and X-ray Scattering Study. *Macromolecules*, *28*(18), 6128–6137. https://doi.org/10.1021/MA00122A021

28TCA - Soluciones formadoras de películas enriquecidas con extractos naturales y su potencial aplicación en la industria alimentaria

Film forming solutions enriched with natural extracts and their potential use in food industry

Santander Lastra-Ripoll[1*], Luis Mieles-Gomez[1], Edilbert Torregroza-Fuentes[2], Luis A. García-Zapateiro[1], Somaris E. Quintana[1*],

1. Grupo de Investigación en Ingeniería de Fluidos Complejos y Reología de Alimentos, Universidad de Cartagena, Cartagena, 130015, Colombia.
2. Grupo de Investigación Ciencia, Tecnología y Sociedad – CTS, Universidad de Cartagena, 130015, Colombia. E-mails: slastrar@unicartagena.edu.co ; squintanam@unicartagena.edu.co

Resumen

Las soluciones formadoras de películas (SFP) se vienen empleando en la industria alimentaria para la elaboración de empaques comestibles con el objetivo de alargar la vida útil de los alimentos. Actualmente, se están desarrollando películas y recubrimientos comestibles con adición de extractos naturales bioactivos para mejorar sus propiedades de conservación. En ese sentido, el objetivo de este trabajo es la elaboración y caracterización de SFP a base de biopolímeros (goma xantana o almidón de semilla de mango) enriquecidas con extractos naturales y evaluar su potencial aplicación para el desarrollo de productos agro-alimentarios. Se obtuvieron dos extractos naturales con un alto contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante a partir de la cascara de mango (*Mangifera indica*) empleando la técnica de extracción asistida por ultrasonido y almidón de mango a partir de la semilla de mango (*Mangifera indica*) con un contenido de amilosa de 34,35 ± 0,46 %. Además, se desarrollaron dos formulaciones de SFP (1) a base de goma xantana y (2) a base de almidón de mango enriquecida con los extractos naturales, las cuales presentaron características de un gel débil, con un comportamiento más elástico que viscoso (G' > G''). Las características de las soluciones formadoras de película con extracto natural de cascara de mango (*Mangifera indica*) pueden favorecer la formación de películas bioactivas con interesantes propiedades activas y mecánica; la incorporación de extractos naturales en las películas aporto actividad antioxidante potenciando las propiedades de conservación de las películas, convirtiéndolo en una alternativa para alargar la vida útil de los alimentos donde se apliquen.

Palabras clave: Almidón, Compuestos bioactivos, Mango (*Mangifera indica*), Peliculas bioactivas.

Abstract

Film forming solutions (SFP) have been used in the food industry for the production of edible packaging in order to extend the shelf life of food. Currently, edible films and coatings are being developed with the addition of bioactive natural extracts to improve their preservation properties. In this sense, the objective of this work is the elaboration and characterization of SFP based on biopolymers (xanthan gum or mango seed starch) enriched with natural extracts and to evaluate their potential application for the development of agri-food products. Two natural extracts with a high content of total phenolic compounds and antioxidant activity were obtained from mango peel (*Mangifera indica*) using the ultrasound-assisted extraction technique and mango starch from mango seed (*Mangifera indica*). with an amylose content of 34.35 ± 0.46%. In addition, two SFP formulations were developed (1) based on xanthan gum and (2) based on mango starch enriched with natural extracts, which showed characteristics of a weak gel, with a more elastic than viscous behavior (G' > G''). The characteristics of film-forming solutions with natural mango peel extract (*Mangifera indica*) can favor the formation of bioactive films with interesting active and mechanical properties; The incorporation of natural extracts in the films provides antioxidant activity, enhancing the preservation properties of the films, making it an alternative to extend the useful life of the foods where they are applied.

Keywords: Starch, Bioactive compounds, Mango (*Mangifera indica*), Bioactive films

1. Introducción

Las soluciones formadoras de películas (SFP) pueden ser usadas para obtener películas comestibles y biodegradables, desarrollo de empaques activos, recubrimientos comestibles o sistemas de entrega de compuestos (Asasutjarit et al., 2020; Silva-Weiss et al., 2014). En el caso de las películas y recubrimientos comestibles (Calinoiu et al., 2016; González-Henríquez et al., 2019), se utilizan ampliamente para la protección de productos frente a las condiciones de almacenamiento y prolongar su vida útil (Han, 2014).

Las SFP se pueden producir con biopolimeros y/o adición de lípidos o sus mezclas (Han, 2014). Estudios anteriores, han señalado el empleo de diferentes biopolimeros para su producción por ejemplo carboximetilcelulosa, almidones, quitosano y gelatina, los cuales se caracterizan por ser productos biodegradables y no tóxicos. Estos, se obtienen a partir de fuentes renovables y tienen propiedades de formación de películas.

Ahora bien, recientemente, se viene estudiando la incorporación de extractos bioactivos a las SFP con el fin de potencializar la protección contra la oxidación, el crecimiento microbiano, pardeamiento enzimático y perdida de vitaminas (Silva-Weiss et al., 2013). La interacción entre extractos de plantas e hidrocoloides también podría influir en las propiedades fisicoquímicas, tecno-funcionales (Kanatt & Makwana, 2020) y reológicas de los productos a base de hidrocoloides. Sin embargo, la compatibilidad y estabilidad de las SFP enriquecidos con compuestos fenólicos necesita mas estudio.

Las propiedades de flujo de las soluciones formadoras de película son de importancia para la calidad del recubrimiento o película en estado sólido (Peressini et al., 2003) y son primordiales para el diseño de proceso y control de calidad de los materiales alimenticios (Ajila et al., 2007; Marcotte et al., 2001; Steffe, 1996) ya que están relacionadas con su estructura y estabilidad física (Tzoumaki et al., 2011; Yang et al., 2004). Por lo tanto, comprender las propiedades reológicas de SFP es importante para el proceso de fundición de películas preformadas o para aplicar revestimientos en fase líquida directamente sobre las superficies de los productos alimenticios mediante inmersión, cepillado o pulverización. Además, las propiedades mecánicas deseadas de las películas de recubrimiento o embalaje dependen de las propiedades viscoelásticas de SFP (Silva-Weiss et al., 2013, 2014). Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo es la caracterización de soluciones formadoras de películas enriquecidas con extractos naturales y evaluar su potencial aplicación en la industria de alimentos.

2. Materiales y métodos

a. Materiales

Mango (*Mangifera indica*) fueron comprados en estado de madurez comercial en el municipio de Santa Catalina, Bolívar.

Los mangos fueron lavados y desinfectados y luego se procedió a separar las cascaras y semillas del fruto. Las cascaras del mango fueron secadas por liofilización a -40°C durante 48 h; las semillas se lavaron para eliminar cualquier resto de pulpa adherida, luego se secaron a 40 °C durante 4 h en un secador de bandeja para facilitar la separación del *kernel* o nucleo; luego, el *kernel* se separó de la cáscara, se cortó y se secó en un secador de bandeja de aire caliente a 40 ° durante 12 h y se molió (Molino IKA MF 10.1-Cabezal de corte Alemania) para obtener la harina con tamaño de partícula inferior a 200 μm.

Se adquirió etanol (99,5% de pureza) de Panreac (Barcelona, España), hidróxido de sodio (NaOH, grado analítico), éter de petróleo (grado analítico), bisulfito de sodio ($NaHSO_3$) y soluciones tampón (ácido bórico / cloruro de potasio / hidróxido de sodio) de Merck Millipore (Múnich, Alemania).

b. Obtención de extractos naturales

La obtención de extractos naturales se llevo a cabo siguiendo la metodología descrita por Quintana et al., (2020) con algunas modificaciones. La extracción se realizó mezclando en una relación 1:10 de cascara de mango con disolvente, empleando etanol (EMEtoH) y mezclas etanol: agua 50:50 EMEtoH-H_2O, aplicando un proceso de ultrasonidos a 240 W durante 20 min. Posteriormente se filtro y el líquido resultante se llevó a sequedad mediante evaporación a vacío en un rotavapor con un baño de agua a 40 ºC y posteriormente a liofilización empleando un Labconco Freezone 1.5 Liter Benchtop Freeze. Los rendimientos (%R) de extracción fueron calculados siguiendo la ecuación 1:

$$\% R = \frac{extracto\ de\ guanaban\ (g)}{hojas\ de\ guanabana\ (g)} \times 100 \qquad (1)$$

c. Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos obtenidos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Brevemente, se mezclaron 50 µL de extracto con 3 mL de agua miliQ y 250 mL de reactivo de Folin Ciocalteu. El contenido se mezcló completamente y después de 3 min, se añadió a la mezcla 750 mL de solución de carbonato de sodio (20% de masa) y 950 mL de agua MilliQ. La mezcla se mantuvo durante 2 h a temperatura ambiente y en la oscuridad, luego se midió la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como GAE (mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto). Todos los análisis se realizaron por triplicado

d. Determinación de actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante el ensayo de eliminación de radicales $ABTS^{\cdot+}$ siguiendo el método descrito por Re et al., (1999). El catión radical $ABTS^{\cdot+}$ se generó mezclando una solución madre $ABTS^{\cdot+}$ (7 mM) con persulfato de potasio 2,45 mM después de la incubación de la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h en la oscuridad. Una vez formado el radical $ABTS^{\cdot+}$, la absorbancia de la solución se ajustó a 0,700 ± 0,02 a 734 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente, se añadieron 990 µL de solución $ABTS^{\cdot+}$ a 10 µL de muestra y la mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente y bajo oscuridad, hasta que la absorbancia alcance una meseta. La absorbancia se registró a 734 nm y los resultados se expresarán como valor IC_{50} (concentración inhibitoria: concentración de extracto necesaria para inhibir la concentración inicial de radicales en un 50%), así como equivalentes de Trolox (TEAC) (µmol de extracto de Trolox/g), que se calcularan teniendo en cuenta el estándar Trolox y las concentraciones de muestra que producen la eliminación del 50% del radical $ABTS^{\cdot+}$.

e. Obtención de almidones

El almidón de semilla de mango se aisló utilizando un método descrito por Mieles-Gómez et al., (2021) con algunas modificaciones. La harina se suspendió en una solución de bisulfito de sodio al 1% (proporción 1:10 p/v) y se sometió a agitación magnética durante 4 h temperatura ambiente. La mezcla se homogeneizó en un ultra-turrax (T20 digital Ultra-Turrax), luego se filtró a través de una malla 100, después de lo cual el residuo se lavó a fondo con agua destilada. Se dejó el filtrado durante 30 min y se decantó el sobrenadante; el residuo de almidón se re-suspendió en agua destilada y luego se centrifugó a 3000 x g durante 10 min para precipitar el almidón. El almidón de semilla de mango se secó en un secador de bandeja a 40 °C durante 12 h.

f. Elaboración de soluciones formadoras de películas

Se prepararon soluciones formadoras de películas con goma xantana y almidón de mango y diferentes porcentajes de extracto de cascara de mango (*Mangifera indica* L) (1,0 y 2,0%) obteniendo un total de 6 formulaciones como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones de SFP

Código	GX %	AM %	EMEtOH %	EMEtOH-H_2O %
GX	0,5	--	--	--
GX -EMEtOH-1%	0,5	--	1	--
GX -EMEtOH-2%	0,5	--	2	--
AM	--	5	--	
AM-EMEtOH-H_2O-1%	--	5	--	1
AM-EMEtOH-H_2O-2%	--	5	--	2

GX: Goma xantana
AM: Almidon de mango

La solución de goma xantana se preparó siguiendo los procedimientos descritos por Fasihi et al., (2019) con alguna modificación. Brevemente, se diluyó la goma xantana en agua destilada (0,5%p/p). La solución se calentó a 40 ºC con agitación constante durante 1 h. Posteriormente se adicionó el glicerol (2% p/p) como agente plastificante y tween 80 (1% p/p) como agente emulsificante. Posteriormente se añadió extracto en los porcentajes correspondientes, mezclando mediante agitación magnética durante 15 min y homogeneizando, empleando un Ultra Turrax (T20 digital Ultra-Turrax) a 10000 rpm durante 3 min.

La solución formadora de película con almidón de kernel de mango, se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Zhang et al.(2020) con una pre-gelatinización del almidón (5%p/p) a 90°C durante 20 minutos, luego se llevó a 60°C para adicionar el glicerol (2%p/p) durante 10 minutos, para luego adicionar el extracto a 40°C y finalmente homogenizar a 10000 rpm durante 3 minutos.

g. Caracterización reológica

Se realizaron ensayos reológicos en estado oscilatorio con el objetivo de identificar las propiedades viscoelásticas de las soluciones

formadoras de película empleando un sistema de reómetro avanzado modular Mars 60, Haake (Thermo-Scientific, Karlsruhe Alemania) equipado con un sistema peltier y utilizando una geometría de plato- cono de 1° (35 mm ⌀).

Inicialmente se realizo la prueba de barrido de esfuerzo se realizó dentro del rango de 0.01 a 1000 Pa y con frecuencia angular de 0.1 Hz en todas las muestras, con el fin de determinar el régimen viscoelástico lineal (LVR). Con base en los resultados de estos experimentos, el barrido de frecuencia se realizó a 0.1 Pa, para mantener el esfuerzo en el LVR, dentro del rango de 0.01 a 100 rad · s^{-1}.

h. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media ± error estándar y el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.

3. Resultados y Discusión

a. Obtención de los extractos naturales

Diferentes extractos naturales se obtuvieron a partir de la cascara de mango (*Mangifera indica*) con etanol (EMEtOH) y etanol agua (EMEtOH-H_2O)se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimientos de extracción (%R), compuestos fenólicos totales (TPC) y actividad antioxidante (ABTS) de los extractos de cascara de mango (*Mangifera indica*)

Extracto	% R	TPC*	ABTS**
EMEtOH	11,35 ± 2,05	294,60 ± 0.03	436,77 ± 5,30
EMEtOH-H_2O	33,43 ± 0,26	305,04 ± 10,70	1470,41 ± 59,75

*TPC: GAE/100 g de extracto
**ABTS: $\mu Mol\ Trolox/gextracto$

Teniendo en cuenta los disolventes utilizados, los rendimientos de extracción incrementaron con el empleo de agua presentando rendimientos 11.35 ± 2.05 % y 33,43 ± 0,26 % para EMEtOH y EMEtOH-H_2O respectivamente; por lo que se puede indicar que la adición de un 50% de agua a el etanol como disolvente utilizado, lleva consecuentemente a el aumento de la polaridad del disolvente y con esto una mayor extracción de compuestos. El etanol se clasifica como un disolvente prótico polar, debido a sus grupos hidroxilos, y un donante de enlaces de hidrógeno, lo que da lugar a la extracción preferente de compuestos de bajo peso molecular, como los compuestos fenólicos, así, se tiene afinidad con los compuestos bioactivos de la matriz sólida, haciendo que el sistema de disolventes sea selectivo en la extracción (Martínez-Ramos et al., 2020).

Resultados similares sobre rendimiento en la obtención de extractos naturales han sido reportados previamente en extractos de la raíz de regaliz (Quintana et al., 2020) con valores de 3,85 ± 0,46% implementando etanol como solvente, mientras que los valores de rendimiento aumentaron a 25,14 ± 1,07 % al implementar una mezcla 50:50 de etanol:agua. Además, se ha comprobado que para mejorar la eficiencia de extracción de compuestos bioactivos, la combinación de solventes ha mostrado mejores resultados debido a las interacciones que se presentan con los compuestos según la polaridad de los solventes utilizados (Anwar & Przybylski, 2012).

b. Compuestos fenólicos totales (TPC) y Actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos totales (TPC) de los extractos de cascara de mango (*Mangifera indica*) no presentaron una variación con la polaridad de disolvente empleado, donde se obtuvieron valores de 294,60 ± 0,03 y 305,04 ± 10,70 mg GAE/g extracto para EMEtOH y EMEtOH-H_2O respectivamente.

El contenido fenólico total (TPC) reportado en este trabajo fue similar al reportado por otros autores para la cascara de mango empleando extracción asistida por ultrasonido para la variedad Haden los extractos presentaron valores 293 mg/100 g de extracto seco (Barreto et al., 2008) y variedad Kent, 234-9121 mg/100 g de extracto seco (Berardini et al., 2005); Además, se presentaron valores de 205.08 mg GAE/100 g de materia seca empleando mezcla de etanol y acetona (60-40%), (Martínez-Ramos et al., 2020); estas diferencias podrían atribuirse a diferentes factores como la base genética, las prácticas agronómicas, la etapa de cosecha y las condiciones ambientales, entre otros (Pierson et al., 2014; Schieber et al., 2000). Ahora bien, estos valores se pueden atribuir a la presencia de ciertos compuestos específicos de alto interés como lo son: polifenoles, antocianinas, carotenoides, flavonoles, vitamina E y vitamina C. (Martínez-Ramos et al., 2020).

De igual manera en la Tabla 2 se encuentran listados los valores obtenidos para la actividad antioxidante de los extractos con valores de 436,77 ± 5,30 y 1470,41± 59,75 µMol Trolox/ g extracto para EMEtOH y EMEtOH-H2O

respectivamente, mostrando así una interacción positiva entre los extractos y el radical ABTS+, lo que sugiere la presencia de compuestos donantes de hidrógeno o electrones, que pueden estabilizar la reacción con el radical $ABTS^{\cdot+}$ en los extractos de cascara de mango (*Mangifera indica*) (Benavides-Guerrero et al., 2020).

De acuerdo con diferentes investigaciones, los compuestos fenólicos contribuyen significativamente a la actividad antioxidante de los extractos de plantas (104,105). De forma general, se afirma que cuanto mayor es el valor de TPC, mayor es la actividad antioxidante. En este trabajo, a pesar de tener valores próximos de TPC se puede observar que los extractos obtenidos con etanol presentaron una menor actividad antioxidante que los obtenidos con etanol-agua ($p < 0.05$), luego, la adición de agua al solvente orgánico mejoró la extracción de compuestos polares y la actividad antioxidantes.

c. Almidón de semilla de mango

El almidón de la semilla de mango (*Mangifera indica)* mostró rendimientos de extracción de 59,51 ± 1,35% p/p. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en almidones de semilla de mango de los cultivares indios (60,12 ± 0,53%) (Bharti et al., 2019), y el almidón de semilla de mango inmaduro (48,79 ± 1,66%) (Patiño-Rodríguez et al., 2020). El almidón de mando, presento un contenido de amilosa fue 34.35 ± 0,46%, por lo tanto, se puede clasificar como almidón normal (amilosa entre 20- 35 %), presentando valores similares a los almidones convencionales tales como, batata, ñame, maíz, yuca y papa (19,6 - 28,3%)(Hernández-Medina et al., 2008).

d. Propiedades viscoelásticas de las soluciones formadoras de películas

Para analizar las propiedades viscoelásticas de las soluciones formadoras de película se llevaron a cabo barridos de esfuerzo para determinar el rango de viscoelasticidad lineal, el cual se obtuvo en el rango de valores de 0,001–0,1Pa para las formuladas con almidón de semilla de mango, mientras que para las soluciones de goma xantana el rango fue de 0.01- 4Pa, lo cual indica que las soluciones con goma xantana presentan mayor resistencia a la deformación, lo que permite soportar las condiciones de procesamiento en el empaque de alimentos (López et al., 2010).

En la Figura 1 se pueden observar los espectros mecánicos en el rango de viscoelasticidad lineal de las soluciones formadoras de películas a base de goma xantana y de almidón de semilla de mango con los naturales presentaron un módulo de almacenamiento (G') fue mayor que el módulo de pérdida (G'') en todo el rango de frecuencia estudiado para todas las soluciones formadoras de película; por lo que se puede establecer que el componente elástico de las soluciones formadoras de película predomina sobre el componente viscoso (Rao, 2014), como principal característica de una red de macromoléculas enredadas formando una solución tipo gel.

Los valores de G' y G'' indican una alta dependencia de la función del polímero utilizado, donde las soluciones formadoras de película preparadas con goma xantana son más fuertes que las muestras preparadas con almidón de kernel de semilla de mango y esto se debe a que según la estructura de los polímeros utilizados, estos tienen la capacidad de formar redes entre las moléculas que se cohesionan debido a una fuerte interacción intermolecular, lo que les confiere buenas propiedades mecánicas y de barrera a los gases O_2 y CO_2 (Mederos-Torres et al., 2020). En general todas las muestras presentaron un comportamiento similar, desarrollando una zona de meseta, de tal manera que se exhibe una baja dependencia a la frecuencia, un comportamiento cuasi-elástico, típico de los sistemas conocidos como geles débiles (Sanz et al., 2017). No obstante, la adición de los extractos no presentó cambios significativos ($p < 0,05$) en el comportamiento, lo que significa que los extractos de cáscara de mango podrían emplearse en una proporción elevada (>2%) y sugiere que no modificaría las propiedades viscoelásticas de las muestras, pero con un interesante aumento en su potencial bioactivo. Resultados similares han sido reportados en la soluciones formadoras de biopelículas de quitosano con la adición de extracto de la hoja de murta (*Ugni molinae*) (Silva-Weiss et al., 2013), y la mezcla de proteína aislada de suero y goma xantana con la implementación de curcumina (Geremias-Andrade et al., 2017)

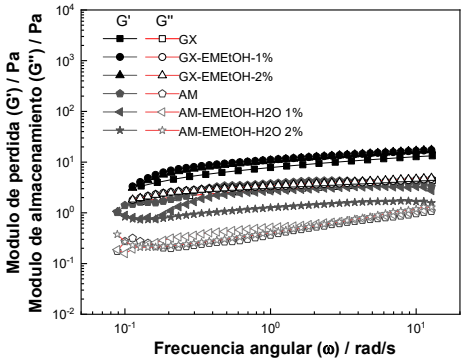


Figura 1. Barrido de frecuencia de soluciones formadoras de películas.

Las propiedades viscoelásticas de las soluciones obtenidas en este trabajo indican un potencial uso como películas mediante el proceso de casting, teniendo en cuenta que las soluciones con alta viscosidad y baja tensión superficial promueven una mejor superficie de formación de película (Vargas et al., 2009).

El estudio de las propiedades viscoelásticas dinámicas de las soluciones formadoras de películas permitió obtener información sobre el entrelazamiento molecular y la formación de redes moleculares durante el secado (Li et al., 2020). Todos los casos estudiados presentaron G' > G'' (Figura 1), lo que indica que las soluciones tanto de goma xantana como de almidón de semilla de mango (*Mangifera indica*) y extractos de cascara de mango (*Mangifera indica*) son materiales valiosos para ser aplicados como películas en recubrimientos de alimentos, ya que pueden mejorar la adhesividad y la dureza de la solución de recubrimiento.

4. Conclusiones

La obtención de extractos naturales a partir de cascara de mango se encuentra principalmente determinada por las condiciones de tiempo y potencia en el ultrasonido, debido a el aumento en el efecto de la cavitación, pero el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante no presenta variaciones al incrementar las condiciones de procesamiento. Los extractos se pudieron estabilizar hasta en 2% en sistemas gelificados de dos polisacáridos importantes como el almidón y la goma xantana, lo que permite la aplicación de estos extractos en películas activas y que presenten excelentes características mecánicas gracias a las soluciones formadoras de películas tipo gel, que han demostrado la formación de películas mas uniformes implementando el método de casting al relacionarse fuertemente con la estructura y estabilidad física de la película.

5. Referencias

Ajila, C. M., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, *102*(4), 1006–1011. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.036

Anwar, F., & Przybylski, R. (2012). Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (Linum usitatissimum L.). *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, *11*(3), 293–301.

Asasutjarit, R., Sookdee, P., Veeranondha, S., Fuongfuchat, A., & Itharat, A. (2020). Application of film-forming solution as a transdermal delivery system of piperine-rich herbal mixture extract for anti-inflammation. *Heliyon*, *6*(6). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04139

Bai, X., Lai, T., Zhou, T., Li, Y., Li, X., & Zhang, H. (2018). In Vitro Antioxidant Activities of Phenols and Oleanolic Acid from Mango Peel and Their Cytotoxic Effect on A549 Cell Line. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 6). https://doi.org/10.3390/molecules23061395

Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalder, B., & Owen, R. W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (Mangifera indica L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(14), 5599–5610. https://doi.org/10.1021/jf800738r

Benavides-Guerrero, R., Revelo-Cuarán, Y. A., Arango-Bedoya, O., & Osorio-Mora, O. (2020). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from two varieties of an Andean native potato (Solanum phureja) and evaluation of their antioxidant activity. *Informacion Tecnologica*, *21*(5), 43–50. https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000500043

Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Screening of Mango (Mangifera indica L.) Cultivars for Their Contents of Flavonol O- and

Xanthone C-Glycosides, Anthocyanins, and Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1563–1570. https://doi.org/10.1021/jf0484069

Bharti, I., Singh, S., & Saxena, D. C. (2019). Exploring the influence of heat moisture treatment on physicochemical, pasting, structural and morphological properties of mango kernel starches from Indian cultivars. *Lwt*, *110*(April), 197–206. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.082

Calinoiu, L. F., Vodnar, D., & Precup, G. (2016). A Review: The Probiotic Bacteria Viability under Different Conditions. *Science and Technology; Vol 73, No 2 (2016): Bulletin Of University Of Agricultural Sciences And Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science And Technology*. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:12448

Corona-Jiménez, E., Martínez-Navarrete, N., Ruiz-Espinosa, H., & Carranza-Concha, J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenolicos de semillas de chia (*Salvia hispanica l.*) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, *50*(4), 403–412.

Fasihi, H., Noshirvani, N., Hashemi, M., Fazilati, M., Salavati, H., & Coma, V. (2019). Antioxidant and antimicrobial properties of carbohydrate-based films enriched with cinnamon essential oil by Pickering emulsion method. *Food Packaging and Shelf Life*, *19*, 147–154. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.007

Geremias-Andrade, I. M., Souki, N. P. D. B. G., Moraes, I. C. F., & Pinho, S. C. (2017). Rheological and mechanical characterization of curcumin-loaded emulsion-filled gels produced with whey protein isolate and xanthan gum. *LWT*, *86*, 166–173. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.063

González-Henríquez, C. M., Sarabia-Vallejos, M. A., & Rodriguez-Hernandez, J. (2019). Polymers for additive manufacturing and 4D-printing: Materials, methodologies, and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *94*, 57–116. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.03.001

Han, J. H. (2014). Chapter 9 - Edible Films and Coatings: A Review. In J. H. B. T.-I. in F. P. (Second E. Han (Ed.), *Food Science and Technology* (pp. 213–255). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6

Kanatt, S. R., & Makwana, S. H. (2020). Development of active, water-resistant carboxymethyl cellulose-poly vinyl alcohol-Aloe vera packaging film. *Carbohydrate Polymers*, *227*, 115303. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115303

Li, C., Xiang, F., Wu, K., Jiang, F., & Ni, X. (2020). Changes in microstructure and rheological properties of konjac glucomannan/zein blend film-forming solution during drying. *Carbohydrate Polymers*, *250*, 116840. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116840

López, O. V., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2010). Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, *100*(1), 160–168. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041

Marcotte, M., Taherian, A. R., Trigui, M., & Ramaswamy, H. S. (2001). Evaluation of rheological properties of selected salt enriched food hydrocolloids. *Journal of Food Engineering*, *48*(2), 157–167. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00153-9

Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J., Watson, N. J., Ruiz-López, I. I., Che-Galicia, G., & Corona-Jiménez, E. (2020). Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (Mangifera indica L.). *Food and Bioproducts Processing*, *122*, 41–54. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.011

Mederos-Torres, Y., BernabÃ\copyright-Galloway, P., & RamÃ\-rez-Arrebato, M. Ã. (2020). PelÃ\-culas basadas en polisacÃ!`ridos como recubrimientos biodegradables y su empleo en la postcosecha de los frutos. *Cultivos Tropicales*, *41*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362020000300009&nrm=iso

Mieles-Gómez, L., Lastra-Ripoll, S. E., Torregroza-Fuentes, E., Quintana, S. E., & García-Zapateiro, L. A. (2021). Rheological and Microstructural Properties of Oil-in-Water Emulsion Gels Containing Natural Plant Extracts Stabilized with

Carboxymethyl Cellulose/Mango (Mangiferaindica) Starch. In *Fluids* (Vol. 6, Issue 9). https://doi.org/10.3390/fluids6090312

Patiño-Rodríguez, O., Agama-Acevedo, E., Ramos-Lopez, G., & Bello-Pérez, L. A. (2020). Unripe mango kernel starch: Partial characterization. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 101). https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105512

Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C., & Sensidoni, A. (2003). Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, *59*(1), 25–32. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00426-0

Pierson, J. T., Monteith, G. R., Roberts-Thomson, S. J., Dietzgen, R. G., Gidley, M. J., & Shaw, P. N. (2014). Phytochemical extraction, characterisation and comparative distribution across four mango (Mangifera indica L.) fruit varieties. *Food Chemistry*, *149*, 253–263. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.108

Quintana, S. E., Llalla, O., García-Zapateiro, L. A., García-Risco, M. R., & Fornari, T. (2020). Preparation and Characterization of Licorice-Chitosan Coatings for Postharvest Treatment of Fresh Strawberries. *Applied Sciences*, *10*(23), 8431. https://doi.org/10.3390/app10238431

Rao, A. M. (2014). Measurement of Flow and Viscoelastic Properties. In *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods. Food Engineering Series.* (pp. 63–159). Springer, Boston, MA. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9230-6_3

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9), 1231–1237. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Sanz, T., Salvador, A., & Hernández, M. J. (2017). Chapter 11 - Creep–Recovery and Oscillatory Rheology of Flour-Based Systems. In J. Ahmed, P. Ptaszek, & S. B. T.-A. in F. R. and I. A. Basu (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 277–295). Woodhead Publishing. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00011-5

Schieber, A., Ullrich, W., & Carle, R. (2000). Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *1*(2), 161–166. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00015-1

Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. A., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, *31*(2), 458–466. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.028

Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. A., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Polyphenol-rich extract from murta leaves on rheological properties of film-forming solutions based on different hydrocolloid blends. *Journal of Food Engineering*, *140*, 28–38. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.04.010

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152–178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (Freeman Pr).

Tzoumaki, M. V, Moschakis, T., Kiosseoglou, V., & Biliaderis, C. G. (2011). Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocolloids*, *25*(6), 1521–1529. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.008

Vargas, M., Chiralt, A., Albors, A., & Gonzalez-Martinez, C. (2009). Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. *Postharvest Biology and Technology*, *51*, 263–271. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.07.019

Yang, H., Irudayaraj, J., Otgonchimeg, S., & Walsh, M. (2004). Rheological study of starch and dairy ingredient-based food

systems. *Food Chemistry*, *86*(4), 571–578. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.004

Zhang, L., Liu, Z., Sun, Y., Wang, X., & Li, L. (2020). Effect of α-tocopherol antioxidant on rheological and physicochemical properties of chitosan/zein edible films. *LWT*, *118*, 108799. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108799

29TCA - Desarrollo de un nuevo producto: Costillar de conejo salado y curado.

Development of a new product: Salted and cured rabbit ribs.

Marcelo Ponti[1], Jorge Jarabo[1], Cynthia Kossman[2] y Alicia Gallo[1]

1. Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina.
2. Escuela Agrotécnica El Tatú, Zárate, Buenos Aires, Argentina.
   E-mail: aligsgo@gmail.com

Resumen

El presente trabajo completa el agregado de valor a la crianza de conejo, en el marco de un proyecto Procodas integrado por la Escuela de Educación Agropecuaria N°1 (Paraje el Tatú, Zárate) junto a la UNLu. Para el aprovechamiento integral de la carne en una primera etapa se elaboraron jamón crudo de conejo, fiambre cocido de conejo, y chorizo fresco de conejo y cerdo, en una segunda alternativa para optimizar el uso del corte del centro, se desarrolló el fiambre de panceta ahumada con hueso. En este mismo camino, se plantea como objetivo, la elaboración de costillar de conejo salado y curado. Para la elaboración de los productos, cumpliendo con la normativa higiénico sanitaria, se utilizaron aditivos permitidos por el CAA y materiales usuales en la industria cárnica. El costillar de conejo salado y curado en los ensayos preliminares de análisis sensorial obtuvo resultados satisfactorios. Además, se brinda a una escuela agro-técnica la alternativa de aprovechamiento integral de su producción de carne de conejo y un agregado de valor en la comercialización de productos cárnicos tipo delikatessen

Palabras clave: conejo, aprovechamiento, tercio del centro, panceta salada y curada.

Abstract

This work completes the addition of value to rabbit breeding, within the framework of a Procodas project integrated by the School of Agricultural Education N ° 1 (Paraje el Tatú, Zárate) together with UNLu. To achieve integral use of meat, in a first stage, raw rabbit ham, cooked rabbit cold cuts, and fresh rabbit and pork chorizo were elaborated, in a second alternative to optimize center cut use, bacon cold cuts were developed. Smoked with bone, in this same way the objective is to prepare salted and cured rack of rabbit. Products elaboration, complying with the hygienic sanitary regulations, additives allowed by the CAA and usual materials in the meat industry, were used. Salted and cured rack of rabbit in the preliminary tests of sensory analysis obtained satisfactory results. In addition, the alternative of comprehensive use of rabbit meat production at agro-technical school is offered, and an added value in the commercialization of delikatessen-type meat products.

Keywords: rabbit, harvest, third of the center, salted and cured bacon

1. Introducción

La carne de conejo presenta la ventaja nutricional del elevado aporte proteico y bajo nivel de lípidos (20% de proteína, 4% de grasa y 73% de humedad) (Tablas de Composición de Alimentos de Uruguay e Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 2017).
En nuestro país el bajo consumo se refleja en la faena. A partir de 2002, se percibió un incremento que llegó a un máximo de 2.618.725 cabezas de conejo en el año 2005. Luego se produjo una retracción de cabezas/año que se acentúa en los registros de los últimos tres años: 37.823 (2017), 34.259 (2018) y 10.217 (2019).

Los frigoríficos habilitados para la faena de conejo por SENASA para tránsito federal en el año 2019 eran 11 establecimientos, de los cuales sólo 5 estuvieron activos, el resto suspendidos o sin movimientos.
Los datos disponibles del consumo aparente en Argentina para el año 2019 muestran un mínimo consumo de 0,82 gr/hab./año.
De los productos cárnicos tradicionales, más del 80% se elaboran a partir de carne de cerdo, con menor contenido de carne de vacuno, pato, conejo y de caza (Weicai Zeng *et al*., 2016).
La carne de conejo (sin piel y sin grasa) está dentro de los alimentos elegidos para reducir el colesterol, por lo que se recomienda su consumo diario (Pérez-Jiménez *et al*., 2006). Y se ha utilizado en otros

países en la formulación de embutidos (Cury *et al*., 2011).
Puntualmente sobre los productos fiambre cocido de conejo y jamón crudo de conejo, no hay bibliografía internacional disponible. Como parte de proyectos anteriores desarrollamos productos noveles a base de carne de conejo (Ponti y col., 2018 y 2021)
El Código Alimentario Argentino (CAA) en el capítulo VI "Alimentos cárneos y afines", define la carne de conejo como producto de la caza menor (art. 262). Sin embargo, los productos de carne de conejo no se especifican en el CAA**.**
La normativa argentina sólo incluye aquellos elaborados con carne de cerdo y se clasifican en: chacinados (art. 302), diferentes conservas de carne (art. 379) y particularmente Salazones (art. 286), que a su vez se dividen en húmedas y secas.
En salazones húmedas, la sal se emplea en forma de salmuera, por ejemplo, para el producto panceta ahumada cocida.
En el caso de las secas, el cloruro de sodio se emplea como tal, como por ejemplo en panceta salada (art. 298) y jamón crudo**.**
El presente trabajo completa el agregado de valor a la crianza de conejo, en el marco de un proyecto Procodas integrado por la Escuela de Educación Agropecuaria N°1 (Paraje el Tatú, Zárate) junto a la UNLu.
En una primera etapa se elaboraron jamón crudo de conejo, fiambre cocido de conejo, y chorizo fresco de conejo y cerdo (Ponti y col. 2018). En una segunda alternativa para optimizar el uso del corte del centro, se desarrolló el fiambre de panceta ahumada con hueso (Ponti y col. 2021).
En este mismo camino, para maximizar el uso, aprovechando el tercio del centro del conejo, se plantea como objetivo, la elaboración de costillar de conejo salado y curado.

2. Materiales y métodos

La crianza de conejo se realizó en la Escuela Agrotécnica, donde se crían dos razas carniceras por excelencia: Neozelandés blanco y Californiano, el cruzamiento entre ambas razas, es un híbrido. La faena se efectuó cuando los animales alcanzaron un peso de aproximadamente 3kg. También fueron a faena, reproductores de descarte cuyo peso puede estar entre 4,5 a 5 kg.
Las canales resultantes se mantuvieron congeladas a -18°C. Para su utilización se descongelaron en refrigeración a 5°C durante 24 horas.
La despostada incluyó cortes primario y secundario. En el primario, se separaron los cuartos traseros (piernas), delanteros (brazos) y el centro (depósitos grasos inguinal, escapular y perirrenal, junto con los músculos Longissimus, la pared abdominal y el espinazo).
Simultáneamente se retiraron grasa, pulmón, riñón e hígado.
Para obtener el costillar se realizó un corte secundario, para lograr la separación del hueso del espinazo.
En el proceso industrial, las pancetas de cerdo usualmente se salan con una mezcla de sal entrefina, nitrato de potasio, nitrito de potasio e eritorbato de sodio (sal de cura) y se almacenan en la cámara de salazón cubriendo las piezas con sal gruesa.
Por el menor tamaño de las piezas de conejo, y para evitar un salado excesivo del producto terminado, la operación se realizó por frotado, con un peso exacto de la sal de cura, de acuerdo al peso de la panceta fresca.
En la Tabla 1 se reseñan los ingredientes utilizados.

Tabla 1: Formulación del costillar de conejo salado y curado

MATERIA PRIMA (MP)	Cantidad (kg)
Panceta con hueso de conejo	1
Total Materia Prima	**1**

SAL DE CURA	Cantidad (g/kg MP)
Sal entrefina	40,816
Nitrato de sodio	0,531
Nitrito de sodio	0,204
Eritorbato de sodio	0,939
Total Sal de cura	42,490
ADITIVO Y ESPECIA	**Cantidad (g/kg MP)**
Azúcar blanca	5,306
Pimentón dulce	8,163
Total Aditivo y Especia	13,469
TOTAL FÓRMULA (kg)	**1,056**

El costillar de conejo obtenido de la despostada se estabilizó hasta alcanzar la temperatura de 5°C en el centro del producto. Para el salado se dosificó sal de cura por frotado manual durante 5 minutos de ambas caras de la pieza, según la fórmula de aditivos y especias.
Las piezas se apilaron en contenedores y se mantuvieron en heladera a 4°C durante 3 días. Transcurrido este tiempo los costillares se lavaron superficialmente por chorro de agua para retirar la sal de cura excedente y se dejaron escurrir.
Posteriormente, se mantuvieron en heladera a 4ºC durante 4 días**,** para permitir el reposo o postsalado.
La etapa de secado se realizó en secadero automático con control de temperatura entre 15°C y 20ºC y humedad entre 80-90% HR, durante 4 días.
Una vez finalizada la elaboración, los costillares se envasaron al vacío en envasadora marca Multivac. Se emplearon bolsas de vacío de 200 x 300 mm y 58 micrones de espesor.
Los rendimientos de las etapas de elaboración y la merma del producto terminado se evaluaron por diferencia de peso entre el costillar de conejo fresco y la masa posterior a la operación analizada.

Análisis sensorial
La evaluación sensorial preliminar fue realizada por un panel de 10 jueces semi-entrenados, utilizando una prueba de satisfación con una escala hedónica de 5 puntos.
Para la presentacion ante los evaluadores, previamente se deshuesó el costillar de conejo salado y curado, y luego se feteó para que cada juez recibiera muestras similares.
Los atributos que se seleccionaron fueron el salado, el color rojo de un producto curado y la masticabilidad.
La planilla confeccionada para la evaluacion sensorial incluía las siguientes frases, para describir la opinión sobre los productos:

- Me gusta muchísimo
- Me gusta mucho
- Ni me gusta ni me disgusta
- Me disgusta mucho
- Me disgusta muchísimo

3. Resultados y Discusión

En la figura 1.a se muestra la canal de un conejo faenado y en 1.b, la canal a la salida del freezer

Figura 1. a- Canal recién faenado.

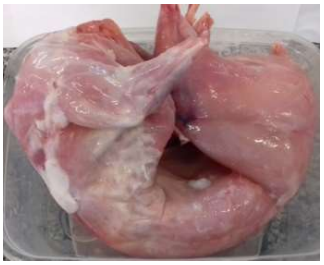


Figura 1.b - Canal congelado

El esquema (figura 2) representa la canal divida en tercios, terminología usada para definir las diferentes zonas Para la elaboración de la panceta salada y curada, se utiliza la zona central.

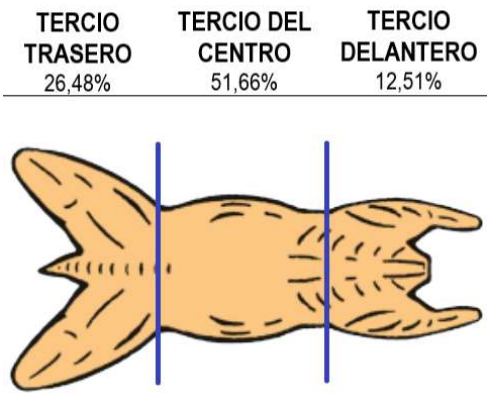


Figura 2: Esquema de sectores de la canal de conejo

En la figura 3 se observa la canal de conejo de la que se han separado pulmón, riñones y grasa perirrenal, a la que posteriormente se realizará la despostada primaria, separando tercio delantero (manos), trasero (patas) y el centro.

Figura 3: Canal de conejo sin pulmón, riñones y grasa perirrenal.

Despostada secundaria
En la despostada secundaria se realiza el deshuesado de los cortes primarios donde se separa cuidadosamente el espinazo (Figura 4).

Figura 4: Separación de espinazo

En el tabla 2 se resumen los rendimientos obtenidos luego de la separación de la panceta con hueso, del tercio central

Tabla 2: Rendimiento en porcentaje del tercio central.

Corte	Porcentaje
Panceta con hueso	**52,31%**
Recorte 90/10	25,06%
Hueso del espinazo	21,63%
Desperdicio	1,00%
Subtotal	100,00%
Merma	0,00%
TOTALES	100,00%

Ya que en el mercado la panceta de cerdo suele comercializarse sin hueso, se realizó un deshuesado, que implica operaciones manuales muy precisas, y un elevado tiempo de proceso (figura 5). El tamaño del producto, no justifica esta operación adicional. Por ello finalmente se decidió utilizar el costillar, que representa el 27,02% en peso de la canal.

Figura 5: Deshuesado de la panceta.

Las figuras muestran algunas etapas de la elaboración de la panceta salada y curada: materia prima, aditivos y especias (figura 6), merma de postsalado (figura 7), secado (figura 8) y producto terminado (figura 9)

Figura 6: Materia prima, aditivos y especia.

Comparando las etapas de elaboración del costillar de conejo salado y curado frente a la panceta de cerdo la mayor diferencia está en su tamaño, que afectará principalmente el salado y secado.
La clasificación de la materia prima por peso tiene como objetivo estandarizar el proceso.

Figura 7: Merma de salado.

El salado en los productos curados ejerce una notable influencia en el color, debido a la presión osmótica ejercida por el mayor ingreso de sal con aditivos nitrificantes en el músculo y la extracción de agua para equiparar las presiones.
Posterior al lavado y escurrido en la etapa de post-salado o reposo se logra la distribución de la sal en la panceta, que se relaciona directamente con el tamaño de la pieza. Para los jamones de cerdo, el tiempo es de 50/60 días y en el caso del producto de conejo desarrollado, solo de 4 días, con la posibilidad de reducir el mismo, a 3 días en trabajo posteriores.

Figura 8. Secadero.

Durante la etapa de secado es importante controlar las variables temperatura y humedad relativa del aire del secadero.
El proceso de secado tiene la ventaja de una menor merma de peso comparado a la elaboración del jamón crudo de conejo (35%). Esta característica se traduce en un mayor valor económico que contribuye en gran medida a una optimización del proyecto.

Figura 9. Costillar de conejo salado y curado

La figura 10 muestra el balance másico desde la canal de conejo hasta la obtención del costillar de conejo salado y curado

Figura 10. Balance másico desde la canal al producto terminado

El costillar de conejo salado y curado reúne las características de un producto premium.
La estabilidad del producto terminado se logró por el adecuado contenido de sal y la consecuente disminución del a_w, la extracción de agua de las piezas, que está directamente relacionada con la merma de peso del costillar salado y curado.
El punto crítico de control en la elaboración de salazones secas está definida por la sumatoria de los parámetros: porcentaje mínimo de sal, porcentaje de nitrito de sodio y actividad acuosa, que se relaciona con una merma típica del producto, a lo largo de los días de elaboración, del 25% (Tabla 3).

Tabla 3. Mermas durante el proceso

ETAPA	DÍAS x ETAPA	MERMA TOTAL (%)
Salado	4	6,15
Postsalado /Secado	8	24,40

Para un futuro lanzamiento del producto al mercado, será necesario cuantificar el contenido de nitrato y nitrito, para verificar el cumplimiento de la reglamentación vigente.

Análisis sensorial

Cabe destacar que las evaluaciones sensoriales realizadas son preliminares.
En la tabla 4 se resumen las calificaciones obtenidas para el producto cárnico costillar de conejo salado y curado, realizada por los jueces semi-entrenados.

Tabla 4. Resultado de los atributos seleccionados para la panceta salada y curada

Atributo	Panceta salada y curada
Salado	8/10
Color	5/10
Masticabilidad	7/10

El costillar de conejo salado y curado presentó una muy buena puntuación de "me gusta" y "me gusta mucho" (8/10) al atributo de salado debido a la relación del diseño de la sal de cura (concentración de sal) y el tiempo de cámara de salado.
En pruebas preliminares se desarrolló el producto sin pimentón, que luego se agregó y se reflejó en una mayor aceptación del color por los jueces
En relación al color también hay que tener en cuenta, el color menos intenso de la carne de conejo fresca frente a la de cerdo.
La textura, en su característica mecánica secundaria de masticabilidad, tuvo una aceptación de 7 sobre los 10 jueces

4. Conclusiones

Es técnicamente posible la elaboración del producto panceta salada y curada con hueso de conejo que cumple las características de un producto Premium.
El producto gourmet desarrollado tiene el valor agregado en la comercialización que no existe actualmente en el mercado argentino.
En una primera etapa se elaboró con el tercio del centro del conejo chorizo fresco de conejo y cerdo, en una segunda alternativa para optimizar el uso del corte se desarrolló el fiambre de panceta ahumada con hueso y en este trabajo el costillar de conejo salado y curado, presenta las ventajas de utilizar el corte del tercio del centro de la canal sin el deshuesado secundario, evitando la mano de obra y considerando el hueso como parte del producto terminado.
Si se compara con la elaboración del chacinado embutido fresco (chorizo) presenta la ventaja de la extensión de la vida útil de 7 días, a una salazón seca envasada al vacío con vida útil de 60 días.
Esta alternativa permitió optimizar el uso de la canal con un aprovechamiento integral de la crianza de conejo.
Se brinda a una escuela agro-técnica la alternativa de agregar valor a su producción de carne, con productos elaborados y logrando consecuentemente la extensión de su vida útil y un aprovechamiento integral de la crianza de conejo.
Este trabajo permitió demostrar la factibilidad técnica de la elaboración de diferentes productos y en un futuro a través de un análisis económico, se definirá la combinación óptima de producción de cada uno de ellos, para maximizar los beneficios.

5. Referencias

Arnau J.; Hugas M.; Monfort J. M. (1987). *"El jamón curado: aspectos técnicos".* Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries. Barcelona, España.

Arnau, J. y Monfort, J. M. (1998). *"El jamón curado: Tecnología y análisis de consumo".* Estrategias Alimentarias, S.L. Madrid, España

Arnau, J.; Guerrero, L; Casademont, G. and Gou, P. (1995). "*Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry-cured ham during processing"*. Food Chem. 52: 63-69.

Cury, K.; Martínez, A.; Aguas, Y.; Olivero, R. (2011). *"Caracterización de carne de conejo y producción de salchicha*". Rev. Colombiana. Cienc. Anim. 3 (2): 269-282.

Dalle Zotte A. 2002. "*Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality*". Livest. Prod. Sci., 75: 11-32.

Dalle Zotte, A.; Szendrö, Z. (2011). *"The role of rabbit meat as functional food".* Meat Science 88 319-331.

Hernández Alarcón E. (2005). *"Evaluación sensorial".* Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Centro Nacional de Medios para el Aprendizaje. Bogotá, Colombia.

Autor desconocido. Sin fecha. Título. Ministerio de Agroindustria de la Nación. Disponible en: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_ganaderia/index.php. Fecha de captura: 06/12/17

Código Alimentario Argentino. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar. Fecha de captura: 02/11/17

INCAP Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Disponible en: http://www.incap.int Fecha de captura: 03/11/17

Tabla composición de los alimentos Uruguay. Disponible en

https://deymerg.files.wordpress.com/2013/07/tabla-de-composicic3b3. Fecha de captura: 03/11/17

Li, Z. (2013). "*Develoment of meat product industry in China".* Meat Industry, 384 (4), 9-11.

Liste, G.; Villarroel, M.; Chacón G.; Sañudo C.; Olleta J. L.; García Belenguer S.; Alierta S.; María G. A. (2009). *"Effect of lairage duration on rabbit welfare and meat quality*". MeatScience 82:71-76

Pérez Jiménez, F; et al. (2006) "*Consejos para ayudar a controlar el colesterol con una alimentación saludable*". Cli Invest Arterioscl. ;18 (3): 104-10

Petracci M.; Rimini S.; Biguzzi G.; Cavani C. (2011). "*The use of marination to provideadded-value rabbit meat"*. In Proc.: Giornate di Coniglicoltura ASIC, 8-9 April, 2011, Forlì, Italy, 185-188.

Weicai Zeng; Wenting Wen; Yue Deng; Yuanyuan Tian; Honghu Sun; Qun Sun. (2016). *"Chinese ethnic meat products: Continuity and development".* Meat Science, 120: 37–46.

Weiss J.; Gibis M.; Schuh V.; Salminen H. (2010). "*Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products"*. Meat Sci., 86: 196-213.

30TCA - Desarrollo de una planta industrial para elaboración de concentrados proteicos de soja y arvejas.

Development of an industrial plant for the production of soybean and pea protein concentrates.

LuisToselli[1], Romina Beltrán[1], Augusto Gallardo[2], Nadia Comba[2], Diego Bosco[2].

1. Grupo de Inv. en Simulación para Ing. Química, GISIQ, FRVM de la UTN, Av. Universidad 450, Villa María, Argentina.
2. Ingeniería de Proyectos. Área de Investigación y Desarrollo, Porta Hnos. S.A., Camino San Antonio km 4,5.
   E-mail: toselli_l@frvm.utn.edu.ar.

Resumen

Se describen las principales características y parámetros de operación de la primera planta industrial de concentrados de proteínas de soja y arvejas del país, que fue desarrollada, instalada y puesta en marcha por el dpto. de Ingeniería de Porta Hnos. S.A.; proyecto del cual ha participado el GISIQ en distintas actividades establecidas en el contexto del convenio de vinculación tecnológica vigente entre las partes. Se presenta un detalle comparativo de las distintas etapas de proceso para las líneas de elaboración de cada tipo de concentrado, descripción de sus capacidades operativas, características de los productos y subproductos derivados con diferentes aplicaciones tanto en alimentación humana como animal, entre otras cuestiones. Como conclusiones se indica las ventajas que presenta poder contar con una tecnología propia, con desarrollo y equipamiento de producción integrado a nivel nacional que permite ofrecer una variedad de productos de alta calidad, menor costo y fácil disponibilidad que resultan muy competitivos en el mercado frente a otras alternativas a las que se accede solo por la vía de importación. Se da respuesta a una demanda creciente de este tipo de concentrados con incorporación de valor agregado a productos agroindustriales generando opciones de comercialización a nivel internacional.

Palabras clave: elaboración de concentrados proteicos, proteína de soja, proteína de arvejas.

Abstract

The main characteristics and operating parameters of the first industrial plant for soy and pea protein concentrates in the country are described, which was developed, installed and started up by the department. of Engineering of Porta Hnos. S.A .; project in which GISIQ has participated in different activities established in the context of the current technological linkage agreement between the parties. A comparative detail of the different process stages for the production lines of each type of concentrate is presented, as well as a description of their operational capacities, characteristics of the products and derived by-products with different applications in both human and animal nutrition, among other issues. Conclusions indicate the advantages of being able to have its own technology, with development and production equipment integrated at the national level that allows offering a variety of high quality products, lower cost and easy availability that are very competitive in the market compared to other alternatives that are accessed only by importation. It responds to a growing demand for this type of concentrates with the incorporation of added value to agro-industrial products, generating commercialization options at an international level.

Keywords: Production of protein concentrates, soybean protein, peas protein.

1. Introducción

Los concentrados son productos relativamente nuevos en el mercado, su disponibilidad comercial es del año 1959 y se han desarrollado, principalmente como mejoradores de sabor y para aumentar el contenido de proteínas de los alimentos. (Berk, 1992; Vioque y col, 2001; Johnson, 1999; Krishnan P. and Darly-Kindelspire, J. 2013; Lusas E. and Rhee K. C. 1995)

Actualmente existe una variedad de concentrados de origen importado, disponibles comercialmente, que han sido diseñados para proporcionar las características deseadas según el tipo alimento que se trate. Estos deben mantener dicha calidad, con igual o similar color, sabor, aroma, textura, composición química y nutricional de los alimentos. (Coscueta, 2017; Wang, et al, 2004).

La disponibilidad de estas fuentes de origen vegetal resulta de creciente interés nutricional para reducir la ingesta de proteína animal. (Ridner, 2006, Food and Drug Administration, 1999).

La recuperación del aceite de semillas de oleaginosas origina un subproducto desgrasado de alto interés industrial por el valor del contenido proteico que presenta. A efectos de considerar la importancia que tiene contar con tecnologías para procesar la matriz sólida desgrasada residual incorporándoles valor agregado, se puede mencionar que Argentina es líder exportador de harina de soja en el mundo (con un 42% de las exportaciones totales por casi 9.190 millones de dólares en 2018/2019) y es el cuarto país productor con aproximadamente 30 Mt en el mismo período (13% de la producción global) siendo ésta el producto más relevante de la balanza comercial, aportando un 15% de las divisas de exportación. (Calzada y Sigaudo, 2019).

La arveja es la segunda leguminosa más cultivada a nivel mundial con una producción aproximada de 16 x 10^6 tn en 2017 (FAO, 2019). Los países asiáticos son los principales consumidores del mundo. Canadá es el mayor exportador, mientras Argentina ocupa el noveno lugar. En Sudamérica, nuestro país es el primer productor y exportador de la misma. (Janzen et al., 2014; Calzada y Treboux, 2019).

Esta leguminosa es considerada la fuente más económica de proteínas (23-33%) tanto para la nutrición humana como animal (Cousin et al., 1985; Gupta et al., 2015). Su cultivo en nuestro país presenta una consideración creciente como una alternativa viable, tanto por su rentabilidad como por sus beneficios cuando actúa como un antecesor de los cultivos de verano, habiéndose demostrado mejoras en los rendimientos posteriores de soja y maíz. (Prieto, 2018).

Se utiliza en la elaboración de diversos alimentos y de almidones, fibras y aislados o concentrados de proteínas (Pea Protein Concentrate o PPC) que se agregan a productos cárnicos cocidos, frescos y embutidos. La posibilidad de alimentar ganado vacuno, lechero, porcino y aves de corral con granos de arveja como reemplazo de la soja en las raciones permite diversificar su producción (Gatti y col, 2021; Espósito y col, 2020).

Dada la importancia tecnológica, comercial y nutricional que presenta este tipo de derivado de origen vegetal, la empresa Porta Hnos. S.A. a través de su dpto. de ingeniería, ha concluido su proyecto de desarrollo, instalación y puesta en operación de la primera planta industrial de concentrados de proteínas de soja y arvejas de la Argentina.

2. Desarrollo del proyecto.

La etapa inicial del proyecto consistió en la evaluación de distintas opciones tecnológicas que se complementó con la ejecución de un plan de actividades experimentales a escala piloto que fue realizado en las instalaciones de la empresa por personal técnico especializado y permitió relevar un importante caudal de información específica acerca del comportamiento de las variables significativas de las distintas etapas y de parámetros operativos que permitieron cerrar adecuadamente la fase de diseño de procesos.

Con dicha información se procedió al escalado a nivel productivo, diseño y montaje de equipos concluyendo con la puesta en marcha de una planta industrial que posee una capacidad instalada de 100 t/mes de SPC (Soy Protein Concentrate) de 65 % mínimo de proteína expresados en base seca (BS).

Proceso de obtención SPC: comienza con la molienda de la matriz sólida residual del poroto desgrasado de soja, a efectos de acondicionar el producto a una granulometría adecuada para ser sometida a una extracción ácida en donde en la fase acuosa se eliminará una fracción importante de los carbohidratos solubles. La condición de pH es regulada para producir la separación de la fracción de proteínas insolubilizadas. La separación de fases se produce por centrifugado eliminando la fracción de agua acuosa y recuperando la fracción de sólidos que se ve incrementada en su porcentaje proteico.

La corriente de concentrado que se obtiene del centrifugado pasa a una segunda etapa de lavado y

separación, en donde se elimina una nueva fracción de solubles que no fueron completamente separados en la primera etapa y se separan los sólidos que constituyen una corriente habitualmente denominada slurry. En esta etapa del proceso la concentración de proteína en la fracción de sólidos ya ha alcanzado la concentración mínima pretendida de 65 %.

La secuencia de operaciones descripta es común para ambos tipos, esto es feed grade (para utilización en alimentación animal) o food grade (destinado a consumo humano). El primero de ellos luego se obtiene haciendo circular el slurry por un horno de secado a temperatura reducida de donde emerge ajustado a los porcentajes establecidos de sólidos totales - humedad, luego pasa por las etapas finales de molienda y envasado, quedando en condiciones de almacenamiento.

La línea de producción de SPC food grade requiere un mayor número de operaciones, así el slurry pasa a una etapa de neutralización en donde es tratado con una solución alcalina que actúa como correctora de pH, a fin de ajustar el producto a las condiciones pretendidas. En esta etapa se produce además una refuncionalización de las proteínas, las cuales recuperan parte de sus propiedades que se habían modificado al ser insolubilizadas.

El slurry neutralizado pasa a una etapa de blanqueo de donde sale ajustado en su tenor de sólidos a efectos de alcanzar la consistencia adecuada para ser alimentado al secadero spray en donde, operando en condiciones controladas de tiempo y temperatura, se obtiene un SPC seco que recibe, finalmente, tratamientos de tamizado, acondicionamiento térmico (atemperado) y envasado para quedar listo para su comercialización. Un diagrama de bloques del proceso se muestra en la figura 1.

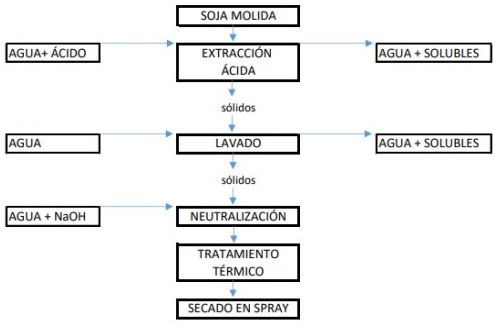


Figura 1: Etapas de proceso de elaboración de SPC (calidad: food grade).

Proceso de obtención de proteínas, almidón y fibra de arvejas: El producto molido, se mezcla con agua fresca (o agua de reciclo en una relación) y se ajusta el pH. La suspensión agitada, luego de cumplido un tiempo de retención, se envía a una centrífuga para separar en 2 fases. El líquido es la corriente con mayor proporción de proteínas (50 a 60 % en BS),

El sólido, compuesto por fibras, almidón y restos de proteínas, se re-suspende con agua (fresca o condensado de la evaporación del permeado), luego se centrifuga. El líquido obtenido de esta segunda centrifugación puede utilizarse para mezclar con la arveja molida que ingresa al proceso o se adiciona con el líquido de la primera centrifugación. El sólido obtenido se envía a la separación de fibras y almidón.El líquido con proteínas obtenido de la primera centrifugación (y segunda centrifugación, en caso que no se recircule) pasa por una malla para separar, posteriormente el líquido que es pasteurizado y enfriado.

El producto se concentra y purifica mediante ultrafiltración. Esta etapa transcurre a temperatura ambiente con pH regulado. El concentrado se libera de la UF con una concentración de proteínas mayor a 85%.

Luego el líquido recibe un tratamiento térmico a temperatura controlada. Finalizado éste el concentrado en proteínas se envía al tanque de alimentación al secadero Spray, desde donde se lo alimenta mediante bombas de alta presión para generar la atomización y secado final del producto.

El polvo seco, con humedad menor a 10%, se tamiza para ajustar su granulometría, el rechazo se muele y reingresa al tamiz. El producto cernido de la zaranda, se envasa a temperatura ambiente y almacena, en bolsas cerradas, en un lugar fresco y seco hasta su despacho.

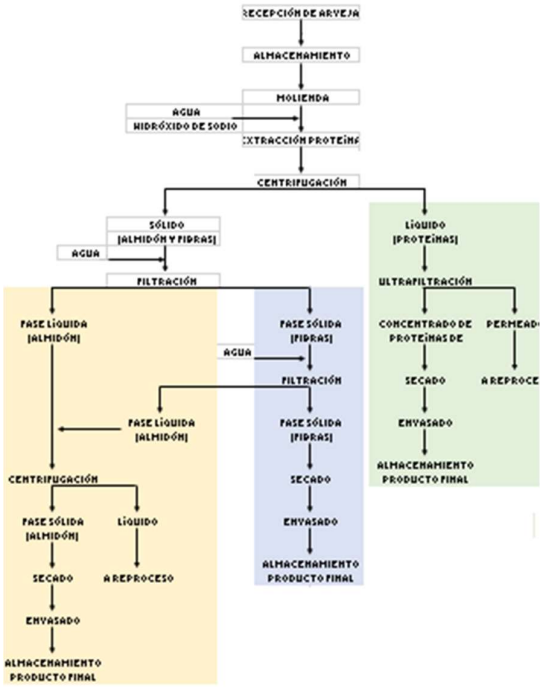


Figura 2: Etapas de proceso de elaboración de PPC y subproductos.

Parte del permeado obtenido en la etapa de UF se reutiliza como líquido de extracción de proteínas y otra parte se envía a un evaporador. De este proceso sale un concentrado de 30% de ST y el condensado se utiliza para la etapa de lavado de proteínas. El sólido separado por la centrífuga en la etapa de lavado de proteínas se mezcla con agua y se filtra. El sólido retenido está constituido por fibra, mientras que el líquido contiene el almidón. La fibra se seca en un horno hasta humedad menor a 10%, se envasa a temperatura ambiente y almacena en bolsas o bolsones.

El líquido remanente de la separación de fibras y almidón se alimenta a una centrífuga con el objetivo de obtener pasta de almidón (>35%ST) y un líquido con bajo contenido de sólidos. La fase líquida se retorna a la etapa de separación de fibras y la pasta de almidón se envía a secado. El polvo de almidón con menos de 10% de humedad se envasa a temperatura ambiente y almacena, hasta su despacho.

3. Resultados y Discusión

La primera etapa del proyecto concluyó a mediados de 2020 con la puesta en marcha de la línea de producción de SPC, en la actualidad se está trabajando en el montaje de la segunda de estas destinada a la producción de concentrado proteico de arveja, fibra y almidón, con fecha de puesta en marcha prevista para febrero de 2022.

Como resultados del proyecto se indica que, desde la óptica de la empresa, se han alcanzado los objetivos inicialmente propuestos en cuanto a disponer de una planta para elaboración, a escala industrial, de productos con mucha proyección de demanda en el mercado y que, hasta la fecha, no formaba parte de su cartera de productos.

Se dispone del know how de una tecnología, de desarrollo propio, que se ha logrado cumpliendo con las proyecciones iniciales de tiempos, costos de desarrollo de ingeniería e inversión para montaje y puesta en marcha que permite presentar al mercado tres tipos de concentrados de alta calidad. Uno apto para nutrición animal y dos SPC de tipo food grade - SPC65H y SPC65HG - que poseen características de normal y alta gelatinización destinados a la producción de alimentos cárnicos, de panificación, bebidas, entre otros. (Ver imágenes en la figura 3).

Figura 3: Variedades comerciales con aplicación a consumo animal y grado alimento, respectivamente.

Los mismos han sido evaluados dentro de un estudio comparativo frente a un producto de origen importado disponible en el mercado, en donde es considerado líder en calidad y tipificado como un SPC Premium, en donde se ha podido establecer que resultan altamente competitivos en calidad y precio (Toselli y col., 2021).

Tabla 1: Detalle de diferentes propiedades fisicoquímicas y organolépticas de SPC food grade - Valores promedio

Producto	Proteínas %	Humedad %	Sólidos Totales %
SPC65H	67,5	5,5	94,5
SPC65HG	67,0	6,2	93,8

Producto	Firmeza de gel [g.]	Firmeza de emulsión [g.]	Retención de agua y aceite
SPC65H	487	350	Cumple esp.
SPC65HG	651	338	Cumple esp.

Producto	Densidad Aparente compactado	Color (parámetro L en gel)	Color (parámetro L en polvo)
SPC65H	0,504	63,1	79,4
SPC65HG	0,489	63,8	81,8

Producto	Organolépticas (olor)	Actividad Ureásica	pH	Test de Gluten
SPC65H	neutro	0,17	6,4	< 10 ppm
SPC65HG	neutro	0,20	6,4	< 10 ppm

A efectos de representar las características principales de sus propiedades funcionales, físico químicas y microbiológicas de los dos últimos SPC citados se muestran en las tablas 1 y 2 un resumen de valores promedio de ensayos realizados a partir de muestras tomadas de un pool de lotes durante un período normal de producción establecido de manera arbitraria.

Tabla 2: Detalle de características microbiológicas de SPC food grade - Valores promedio

Producto	Recuento Total [UFC/g]	Salmonella	E. coli
SPC65H	$1{,}86 \times 10^{+3}$	Ausencia. en 25 g	Ausencia en 10 g
SPC65HG	$1{,}89 \times 10^{+3}$	Ausencia. en 25	Ausencia en 10 g.

Para la industrialización del concentrado proteico de arveja y sus subproductos derivados se ha requerido el desarrollo de una serie de etapas de estudios teóricos y otros de tipo experimental que fueron realizado inicialmente a escalas laboratorio y corroborados luego a escala piloto.

De tales experiencias se obtuvieron valores específicos de las principales variables de operación, que permitieron abordar el escalado del proceso para la elaboración del producto a nivel industrial. Los valores determinados en tales experiencias permitieron validar las predicciones numéricas obtenidas por simulación a partir de modelos desarrollados para evaluación de las operaciones y/o distintas etapas del proceso.

En la tabla 3 se presenta un resumen de las principales características, en valores promedio, del producto principal - PPC- que tipifican el concentrado obtenido en los trabajos experimentales desarrollados.

Tabla 3: Detalle de propiedades fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas de concentrado proteico de arveja – PPC –

Producto	Proteínas	Humedad	Sólidos Totales
PPC	mínimo 85 %	máxima 5%	mínima 95 % BS
	Densidad Aparente	Color	Cenizas
	$0{,}4\ g/cm^3$	crema	menor 6 %
	pH	Test de Gluten	Organolépticas (olor)
	7,8	< 20 ppm	neutro
	Microbiológicos		
	Recuento Total [UFC/g]	E.Coli	Salmonella
	$< 1 \times 10^4$	Ausencia en 10 g.	Ausencia en 25

En la figura 4 se muestran instalaciones correspondientes a la planta industrial de la línea de elaboración de SPC, actualmente en producción.

4. Conclusiones

Como principales conclusiones se cita:

El desarrollo de este proyecto, a criterio de la empresa se considera exitoso por cuanto permite disponer, en la actualidad, de la única planta de elaboración de concentrados proteicos de soja a nivel nacional con una capacidad instalada de 100 t/m.

La tecnología desarrollada permite alcanzar un alto rendimiento (1:1,45 expresada como toneladas de proteína concentrada obtenida por toneladas de harina proteica procesada, ambas indicadas en BS).

Se ha obtenido un concentrado de calidad feed grade que responde en calidad y costo a las características comerciales pretendidas.

Se han obtenido dos concentrados food grade de alta calidad, menor costo y fácil disponibilidad que se han impuesto rápidamente en el mercado nacional por que resultan muy competitivos frente a productos de calidad estándar y Premium, los que actualmente se encuentran disponibles solamente por importación.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 4: Imágenes de planta correspondientes a sala de control, extracción, separación y secado (a, b, c y d; respectivamente)

A la fecha, y aun cuando no ha concluido su según da etapa, el proyecto ha respondido a las expectativas, si se considera que ambos tipos de calidad, feed y food, han abierto nuevos mercados concretándose su comercialización internacional.

La capacidad instalada se ampliará en 70 t/m, al concluir el montaje y puesta en marcha de la línea de producción de PPC, prevista para 2022.

La tecnología aplicada a la producción de concentrado derivado de la leguminosa promedió a escala piloto rendimiento (1:5,3 expresada como toneladas de proteína concentrada obtenida por toneladas de arveja procesada, ambas consideradas en BS).

Debe considerarse que la nueva línea de producción permitirá colocar en el mercado otros dos subproductos con buenos rendimientos y con un valor comercial atractivo como es la fibra y el almidón de arvejas, cuyos estándares de calidad pudieron verificarse, en base a los resultados alcanzados a nivel experimental.

La ingeniería desarrollada para ambas líneas de operación presenta una modalidad modular que posibilita, a futuro, ampliar la capacidad de producción para responder a progresivas demandas del mercado.

Se ha desarrollado una respuesta tecnológica, que incorpora valor agregado, a dos productos de origen agrícola en los cuales Argentina presenta fortalezas como productor a escala mundial, explotando su potencial económico incorporando valor agregado.

A partir de la experiencia desarrollada y luego de evaluar los resultados se indica que, tanto a nivel tecnológico como comercial, la empresa prevé en el mediano plazo ampliar las variedades de SPC a elaborar, partiendo de otras materias primas oleaginosas y/o leguminosas.

5. **Referencias**

ANMAT (2018) *Código Alimentario Argentino. Capítulo XIX: Harinas, Concentrados, Aislados y Derivados Proteínicos*. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat-capitulo_xix_aislados_protactualiz_2018-11.pdf.

Berk Z. (1992). *Technology of Production of Edible Flour and Protein Products from Soybeans*. FAO.

Calzada J y Sigaudo D. (2019). *Breve diagnóstico del mercado mundial y local de harina y pellets de soja*. Informativo Semanal del 20/09/2019, Bolsa de Comercio de Rosario.

Calzada J. y Treboux J. (2019) *Panorama del mercado nacional e internacional de legumbres.* 37 (1912), 28 de junio de 2019, Bolsa de Comercio de Rosario, Argentina.

Coscueta, E. R., (2017). *Desarrollo de Procesos Alternativos para la Detoxificación de Subproductos de Soja. Cap 1 Estado del arte.* Tesis

Doctoral. UNR Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas.

Cousin J.R., Massager A., Vingere A. (1985) Breeding for yield in common peas. The peas Crops. In: Hebblethwaite P.H., Heath M.C., Dawkins T.C.K. (Eds.) Butterworths, 115-129.

Espósito, M. A., Cointry, E.; Gatti, I. (2020) *Primogénita FCA-INTA: Nace una nueva variedad de arveja argentina*, Agromensajes, 50-51, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.

FAO. (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat. Available at: http://www.fao.org/ faostat/en/#data/QC/visualize.

Gatti I., Cazzola F., Bermejo C.J., Guindón M.F., Espósito M.A., Cointry E.L. (2021). *Mejoramiento de Arveja (Pisum sativum L): Avances del programa demejoramiento de la Universidad Nacional de Rosario. BAG*. Journal of Basic and Applied. XXXII (2), 14-22.

Food and Drug Administration, (1999*). Rotulado de alimentos, declaraciones sanitarias, proteína de soja y enfermedad coronaria.* Registro Federal 57: 699-733. http://www.academicjournals.org/AJB https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat-capitulo_xix_aislados_protactualiz_2018-11.pdf.

Gupta R.K., Gangoliya S.S., Singh N.K. (2015) Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. J Food Sci and Tech 52 (2): 676-684.

Janzen J.P., Brester G.W., Smith V.H. (2014) Dry peas: trends in production, trade, and price. Montana: Agricultural Marketing Policy Center. AMPC. Briefing, 57.

Johnson, L. A. (1999). *Process for producing improved soy protein concentrate from genetically-modified soybeans.* Iowa. State University Patents.286. http://lib.dr.iastate.edu/patents/286.

Krishnan P. and Darly-Kindelspire J. (2013) *Food Product Innovations Using Soy Ingredients.* J Hum Nutr Food Sci 1 (2): 1011.

Lusas E and Rhee K. C. (1995). *Practical handbook of soybean processing and utilization. Chapter 8: Soy Protein Processing and Utilization.* Ed: Erickson D. R., AOCS Press.

Prietto G.M. (2018) *Arveja, una alternativa para potenciar la secuencia de cultivos en la zona núcleo.* https://www.clarin.com/rural/arveja-alternativapotenciar-secuencia-cultivoszona-nucleo_0_HJU8AUbGQ.html

Ridner E. (2006). *Soja, Propiedades Nutricionales y su Impacto en la Salud. Capítulo 1. Valor Nutricional de la Soja.* 1a ed.- Buenos Aires. Grupo Q S.A. Sociedad Argentina de Nutrición.

Toselli, L., A. Chesta, A. Gallardo, N. Comba y D. Bosco. (2021). *Evaluación Comparativa de Concentrados proteicos de soja – Food Grade – de Calidad Premium con los productos SPC 65 % tipos H y HB Elaborados por Porta Hnos S.A.* Informe Técnico, FRVM UTN.

Vioque, J, R. Sánchez-Vioque, J. Pedroche, M. Yust y F. Millán. (2001). *Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos.* Grasas y Aceites 127 (52) 127-131.

Wang, H., Johnson L.A. and T. Wang. (2004). *Preparation of Soy Protein Concentrate and Isolate from Extruded-Expelled Soybean Meals*. Paper no. J10816. JAOCS 81, 713–717 (July)

31TCA - Efecto del contenido de humedad en propiedades físicas y mecánicas de semillas de limón.

Effect of moisture content in physical and mechanical properties of lemon seeds.

Agustín Benestante[1,2], Mayra Carolina Chalapud Narvaez[1,2], Erica Baümler[1,2], María Elena Carrín[1,2].

1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur (UNS). Av. Alem 1253, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
2. Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), CONICET - UNS. Camino "La Carrindanga" Km 7, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
   E-mail: mcarrin@plapiqui.edu.ar

Resumen
En el presente trabajo se estudia la dependencia de múltiples propiedades físicas y mecánicas de semillas de limón con la variación de su contenido de humedad (entre 1 y 8 % en base seca), teniendo en cuenta la importancia de su conocimiento para el diseño de equipos y procesos involucrados en la manipulación de semillas. En lo que respecta a las propiedades físicas, se estudiaron las dimensiones, el área proyectada, el volumen teórico, la esfericidad, el peso de 1000 semillas, la densidad real, el volumen real, la densidad y porosidad del lecho. Del mismo modo, las propiedades mecánicas estudiadas fueron la fuerza de rotura, la deformación y la energía por unidad volumétrica a la rotura de las semillas. Con excepción de la densidad y porosidad del lecho, se demostró que la deshidratación redujo significativamente el tamaño de las semillas y generó matrices más frágiles, lo que afectó a las propiedades previamente mencionadas.

Palabras clave: semillas de limón, propiedades físicas, propiedades mecánicas, contenido de humedad.

Abstract
The present work studies the dependence of multiple physical and mechanical properties of lemon seeds with the variation in the moisture content (between 1 and 8 %, dry basis), taking into account the importance of their knowledge for the design of equipment and processes involved in seed handling. With respect to physical properties, the dimensions, surface area, theoretical volume, sphericity, 1000 thousand grains weight, true density, bulk density, and porosity of seeds have been calculated. In the same way, the mechanical properties studied were load, deformation and energy per volumetric at seed rupture. Except for bulk density and porosity, it has been demonstrated that dehydration significantly reduced the size of seeds and also generated a more brittle matrix, affecting the parameters mentioned.

Keywords: lemon seed, physical properties, mechanical properties, moisture content.

1. Introducción

Argentina es el tercer mayor productor de limón a nivel mundial y el principal industrializador con una producción anual de 731 mil toneladas métricas, que corresponde al 71 % de la producción de fruta fresca (USDA, 2021); de modo que esto posiciona también a Argentina como el principal generador de residuos de la industria citrícola. El residuo sólido seco obtenido al final del proceso productivo de elaboración de jugos está compuesto por cáscara, albedo, pulpa y semilla, esta última representa el 1,5 % aproximadamente. Dado los grandes volúmenes de residuos producidos, es necesario el estudio de la factibilidad productiva y la evaluación tecno-económica para su puesta en valor, ya que las semillas son fuente de aceites ricos en ácidos grasos insaturados y proteínas de alto valor biológico (El-Adawy *et al.*, 1999; Laura *et al.*, 2009; Malacrida *et al.*, 2012; Matthaus y Özcan, 2012), como así también fuente de biocompuestos minoritarios (Klimek-Szczykutowicz *et al.*, 2020; Malacrida *et al.*, 2012; Matthaus y Özcan, 2012).

Las propiedades físicas y mecánicas de las semillas están involucradas en el diseño de equipos relacionados con la manipulación, descascarado, separación, secado, aireación, almacenado y procesado, entre otros (Baümler *et al.*, 2006). Además, en el procesamiento convencional de semillas se aconseja su acondicionamiento a humedades < 10 % para mejorar su almacenamiento, como así también para someterlas a un proceso de extracción de aceite posterior (Rao, 2006). Por ello, en la valorización de las semillas cítricas resulta de importancia el estudio de dichas propiedades, considerando el efecto de la humedad de las semillas sobre las mismas.
A lo largo de los años, se han estudiado extensamente las propiedades físicas y mecánicas de aquellas semillas consideradas como principales fuentes de aceite como soja (Pohndorf *et al.*, 2018; Barnwal *et al.*, 2012), maíz (Su *et al.*, 2021), fuentes alternativas como cártamo (Baümler, *et al.*, 2006), almendra (Atteh *et al.*, 2021) y uvas (Mirzabe y Hajiahmad, 2021); y a nuevas semillas cuyo contenido de aceite es relevante como fenogreco (Ahmadi *et al.*, 2009) y kenaf (Izli, 2015). No obstante, son pocas las publicaciones encontradas donde se estudien estas propiedades en semillas cítricas. Fathollahi *et al.* (2020) publicó algunas propiedades para semillas de Lima pérsica como diámetro promedio, superficie y volumen, esfericidad, peso de 1000 semillas, densidad real, densidad de lecho y porosidad para los contenidos de humedad de 44,6 % y 4,6 %.

Al día de la fecha, no se tiene conocimiento de la existencia de publicaciones realizadas sobre las propiedades físicas y mecánicas de semillas de limón (*Citrus lemon* var. Eureka). Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar las propiedades de estas semillas y su dependencia con el contenido de humedad.

2. Materiales y métodos

Preparación de la muestra: Las semillas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas a partir de 60 kg de limón (*Citrus lemon* var. Eureka). Estas fueron removidas manualmente de las frutas, separándolas cuidadosamente de la pulpa. Luego, fueron sanitizadas en solución de cloro de 1,25 ppm, enjuagadas con agua destilada, colocadas sobre papel aluminio y secadas a temperatura ambiente por la noche. Con el fin de alcanzar el contenido de humedad de trabajo, se construyó una curva de secado de las semillas en horno convectivo (temperatura de operación promedio: 55 ºC). Las semillas para cada contenido de humedad deseado fueron secadas de acuerdo a la curva así obtenida, hasta alcanzar valores cercanos al 8 y 4 % en base seca (b.s.), y hasta la condición de humedad más baja alcanzable. Dicho contenido fue cuantificado secando las semillas en estufa de vacío a una temperatura de 60 ºC y vacío de 20 inHg hasta alcanzar peso constante (Método 1.121 (IUPAC, 2013)). Los valores fueron obtenidos por triplicado y expresados en base seca. Las semillas fueron almacenadas en recipientes de vidrio a 4 ºC protegidos de la luz. Finalmente, previo a su uso, las semillas de limón fueron mantenidas fuera de refrigeración hasta alcanzar la temperatura ambiente (Baümler *et al.*, 2006).

Proporción cáscara/semilla: El contenido total de cáscara de la semilla fue determinado descascarando manualmente 10 g de semillas de limón. La cáscara fue removida cuidadosamente con pinzas y separada del germen, el cual representa una sola fracción compuesta por el embrión y el endosperma. La presencia de la capa de aleurona fue considerada irrelevante respecto a en qué fracción se encuentre luego de la separación, debido a que su espesor es << 1 mm y los cambios en el peso que esta pueda generar fueron despreciados. Luego, las cáscaras y el germen fueron pesados y secados independientemente en estufa de vacío a una temperatura de 60 ºC y vacío de 20 inHg hasta alcanzar peso constante (Método 1.121 (IUPAC, 2013)). Finalmente, se expresó la proporción de cáscara como el cociente entre el peso de esta fracción y la suma de ambas. Los valores fueron obtenidos por triplicado y expresados en base seca.

Cinética de secado: El modelo teórico que explica el secado de las semillas con aire caliente está dado por la segunda ley de Fick. Sharaf-Eldeen *et al.*

(1979) propuso una solución general para la ecuación de difusión dada por la sumatoria de distintas contribuciones, cada una representando una cinética de primer orden (Ecuación 1).

$$\theta_m = \sum_{i=1}^{n} A_i \exp(-k_i t) \quad (1)$$

$$\theta_m = \frac{X - X_o}{X_e - X_o} \quad (2)$$

donde X, X_0 y X_e son el contenido de humedad en base seca al tiempo t, a t=0 y en equilibrio con la humedad relativa del aire a la temperatura de secado, respectivamente.

Los datos experimentales (contenido de humedad de las semillas en función del tiempo de secado) fueron recalculados acorde a la Ecuación 2 y ajustados al modelo de la Ecuación 1 utilizando el software Sigmaplot (Systat Software, Inc.).

Peso de 1000 semillas: La cuantificación del peso de 1000 semillas de limón fue llevada a cabo pesando 250 semillas de limón en balanza analítica con precisión de 0,001 g. Luego, el valor fue extrapolado para una cantidad de 1000 semillas. Los valores fueron obtenidos por triplicado a las diferentes condiciones de humedad.

Tamaño y forma: Un micrómetro digital (IP65 Asimeto, Alemania) con una precisión de 0,001 mm fue utilizado para medir la longitud (L), ancho (W) y espesor (T) de las semillas de limón. El diámetro geométrico (D_g) y la esfericidad (φ) de las semillas fueron calculados utilizando las Ecuaciones 3 y 4, respectivamente (Mohsenin, 1986).

$$D_g = (LWT)^{1/3} \quad (3)$$

$$\varphi = \frac{D_g}{L} \quad (4)$$

La superficie proyectada (S_g) y el volumen teórico (V_g) se obtuvieron con las siguientes ecuaciones, considerando forma cono-esférica (Jain y Bal, 1997):

$$B = \sqrt{WT} \quad (5)$$

$$S_g = \frac{\pi B L^2}{(2L - B)} \quad (6)$$

$$V_g = \frac{\pi B^2 L^2}{6(2L - B)} \quad (7)$$

Todos los parámetros fueron calculados para 100 semillas según cada condición de humedad.

Densidad real: El volumen real de las semillas (V_s) fue determinado por el método de desplazamiento de líquido. Dado que la absorción de agua puede llevar a cambiar la humedad de las semillas, se utilizó tolueno como solvente por su baja penetración en la matriz (Mohsenin, 1986). El procedimiento fue estandarizado dado que la presión de vapor del tolueno es mayor que la del agua, y su volatilización podría afectar los valores obtenidos. Primeramente, 1 g de semillas de limón fueron pesadas (W_1) y reservadas. Por otra parte, un picnómetro de sólidos de 20 ml previamente pesado (W_2) fue llenado con tolueno, cubierto con una capa de film plástico, para disminuir la evaporación de solvente, y secado con papel. En ese instante, se comenzó a medir el tiempo y el picnómetro fue colocado sobre la balanza analítica de 0,001 g para registrar su peso a los 60 s (W_3). Luego, se retiró el picnómetro, se colocaron dentro las semillas pesadas previamente y se volvió a realizar el procedimiento descrito para registrar el peso nuevamente (W_4). Así, V_s fue calculado con la Ecuación 8 y la densidad real (ρ_t) como el cociente entre la masa de semillas y el volumen real; se obtuvieron valores por triplicado para cada condición de humedad. La densidad del tolueno ($\rho_{tolueno}$) fue obtenida de la ficha técnica del producto (Anedra), a la temperatura a la que se llevaron a cabo las experiencias (20 ºC).

$$V_s = \frac{(W_3 - W_2) - (W_4 - W_2 - W_1)}{\rho_{tolueno}} \quad (8)$$

Debido a que las semillas de limón tienen formas irregulares y cuentan con pliegues superficiales, se determinó un factor de corrección (K_f) a partir de la siguiente expresión:

$$K_f = \frac{V_s}{V_g} \quad (9)$$

Los valores fueron obtenidos con los valores promedio y los extremos superiores e inferiores de cada parámetro, considerando una distribución normal con un intervalo de confianza del 95 %.

Densidad del lecho: La densidad del lecho (ρ_b) está dada como la relación entre la masa de semillas que ocupa un volumen conocido y dicho volumen. Este parámetro fue determinado con una balanza de Schopper modificada para reducir el volumen de medición. Las semillas fueron colocadas hasta llenar un volumen de 50 ml y su peso fue registrado. Los valores fueron obtenidos por sextuplicado para cada condición de humedad.

Porosidad: La porosidad del lecho de semillas (ε) fue determinado con la siguiente expresión (Mohsenin, 1986):

$$\varepsilon = \frac{\rho_t - \rho_b}{\rho_t} \qquad (10)$$

Los valores fueron obtenidos con los valores promedio y los extremos superiores e inferiores de cada parámetro, considerando una distribución normal con un intervalo de confianza del 95 %.

Propiedades mecánicas: Para la determinación de la fuerza de rotura y la deformación al momento de rotura, las semillas de limón fueron sometidas a una fuerza de compresión hasta que se evidenció la ruptura de la cáscara. Previamente, las semillas fueron examinadas para descartar aquellas con roturas visibles, y sus dimensiones fueron medidas como se detalló en la sección *Tamaño y forma*. Un analizador de textura (Lloyds Instruments, Reino Unido) equipado con una celda de 500 N fue utilizado en esta experiencia. Los valores de carga y deformación fueron registrados por el software NEXYGEN Plus (Lloyds Instruments, Reino Unido) conectado a la unidad de medición. La velocidad de la sonda fue seteada a 1 mm/min (Baümler *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 1998). Cada semilla individual fue posicionada horizontalmente, donde la longitud se encontraba perpendicular al movimiento de la sonda, y fue comprimida entre una superficie plana y la sonda plana hasta la rotura, punto que se puede identificar como un quiebre en la curva fuerza- deformación (Figura 1). En ese punto, se registró la magnitud de la fuerza para la rotura y la deformación final de la semilla. El porcentaje de deformación se obtuvo como la relación entre el ancho de la semilla inicial y la deformación final. La energía para la rotura fue calculada como la integral bajo la curva hasta el punto de quiebre, y fue expresada respecto al volumen individual de cada semilla. Estos parámetros fueron obtenidos para 50 semillas según cada condición de humedad.

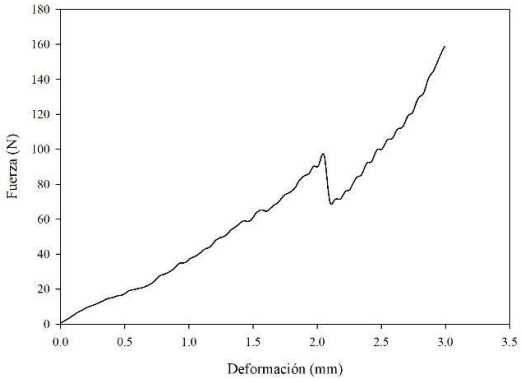


Figura 1. Curva genérica obtenida en el ensayo de compresión de semillas, a 8,28 % b.s.

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos fueron representados como los valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar. A su vez, se analizaron diferencias significativas entre ellas ($p<0,05$) aplicando test de LSD Fisher en ANOVA simple para múltiples comparaciones. Los análisis estadísticos de los resultados fueron realizados con software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

3. Resultados y Discusión

Proporción cáscara/semilla: A partir del secado de los gérmenes y las cáscaras de las semillas, se obtuvo un valor de 38,9150 ± 1,2696 para la proporción de esta última respecto a la totalidad de la matriz. Este factor ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los años para distintas semillas, como por ejemplo para colza (Shirzadegan, 1985; Carré, 2016), girasol (Dedio, 1982; De Figueiredo, 2011), guisantes (Ali-Khan, 1993), algodón (Pahlavani, 2006, entre otros, debido a la importancia que tiene en algunos tratamientos a los que se someten las semillas (por ej. secado).

Secado de las semillas: Los datos experimentales de contenido de humedad de las semillas de limón se estandarizaron según la Ecuación 2 (con valores de 8,56 y 1,47 % b.s. para X_0 y X_e, respectivamente) y se muestran representados en función del tiempo de secado en la Figura 2.

Se puede apreciar que el proceso de secado sigue un comportamiento típico de secado convectivo. Se destaca que la caída abrupta en forma no lineal del contenido de humedad en las primeras 3 horas no representa una tasa de transferencia de agua constante, sino que expone la sequedad de la superficie y ausencia de agua no ligada (Valentas *et al.*, 1997).

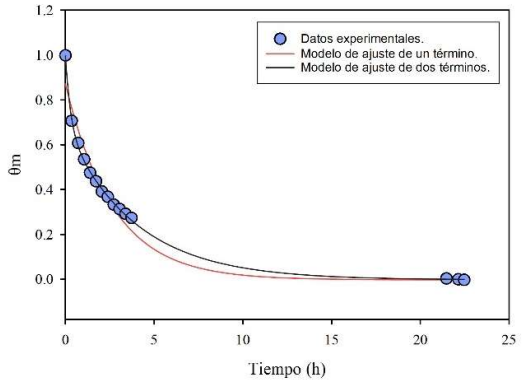


Figura 2. Variación del contenido de agua de las semillas de limón con el tiempo de secado.

Esto está de acuerdo a lo evidenciado visualmente (Figura 3), ya que este proceso de secado se realizó con semillas previamente acondicionadas para su almacenamiento seguro (humedad < 10 %). Así, las semillas siguen secándose y la transferencia de agua hacia la superficie se da hasta alcanzar la humedad de equilibrio con los valores de humedad del aire, que se corresponde con un valor aproximado de 1,5 %.

Figura 3. Semillas de limón: formas irregulares y pliegues superficiales.

Los datos experimentales fueron ajustados con dos modelos difusivos, de uno y de dos términos, respectivamente (Ecuación 1), obteniendo los valores de los parámetros mostrados en Tablas 1 y 2. En el primero, el parámetro k corresponde a la constante de cinética de secado considerando a la semilla como un cuerpo homogéneo. Se aprecia que las semillas de limón son matrices donde se distinguen dos componentes principales: la cáscara y el germen. Así, la humedad de las semillas debe atravesar estas partes para alcanzar la superficie externa desde el centro (Sharma *et al.*, 1982). Es por ello que, con el segundo modelo se pretende lograr una mejor representación de la contribución que tiene cada una de estas fracciones; así, los parámetros k_0 y k_1 corresponderían a las constantes de cinética de secado de la cáscara y el germen, respectivamente.

Tabla 1. Coeficientes del ajuste del modelo difusivo de un término (según Ecuación 1) obtenidos para la cinética de secado de las semillas de limón.

Coeficiente	Valor	Error estándar	p
A	0,8725	0,0365	< 0,0001
k (h-1)	0,3714	0,0303	< 0,0001

Tabla 2. Coeficientes del ajuste del modelo difusivo de dos términos (según Ecuación 1) obtenidos para la cinética de secado de las semillas de limón.

Coeficiente	Valor	Error estándar	p
A0	0,3169	0,0174	< 0,0001
k0 (h-1)	3,4641	0,3917	< 0,0001
A1	0,6816	0,0159	< 0,0001
k1 (h-1)	0,2536	0,0100	< 0,0001

A partir de los valores de p, la observación visual de la Figura 2 y los valores de coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) de 0,9657 y 0,9993 obtenidos para el ajuste con los modelos de uno y dos términos, respectivamente, se encuentra que este último explica más adecuadamente el comportamiento de los datos experimentales obtenidos, indicando la contribución de ambos componentes de las semillas a la transferencia de agua, y no considerando a estas como un cuerpo homogéneo.

El valor de 13,65 obtenido a partir del cociente entre las constantes de las cinéticas de secado k_0 y k_1 evidencia la importancia de la resistencia de la cáscara a la transferencia de agua a través de ella. Por otra parte, el hecho de que la suma de los coeficientes A_0 y A_1 se corresponda con un valor de 1 manifiesta la complementariedad de ambas partes, que están involucradas en el secado de las semillas, y que no pudo ser representado adecuadamente con el modelo de un término (A < 1). Teniendo en consideración la proporción de cáscara/semilla obtenida previamente, se destaca la similitud entre el aporte de cada coeficiente A_0 y A_1 con la proporción de cáscara y germen, respectivamente.

Varios autores han reportado ajustes con el mismo modelo (dos términos) para representar el secado de algunos de los principales cultivos intensivos, como semillas de girasol (Smaniotto *et al.*, 2017), arroz con cáscara (Cihan *et al.*, 2007), maíz (Asemu *et al.*, 2020) y soja (Rafiei *et al.*, 2009), entre otros.

Contenido de humedad: Después del secado en estufa convectiva de cada una de las muestras, el contenido de humedad de las semillas fue verificado en estufa de vacío obteniéndose valores de $8{,}2820^{c} \pm 0{,}2564$, $4{,}6207^{b} \pm 0{,}2514$ y $1{,}3063^{a} \pm 0{,}1006$ % b.s. Dado que todos los superíndices son diferentes, se puede decir que las muestras fueron efectivamente acondicionadas en contenidos

de humedad significativamente diferentes entre ellas ($p < 0,05$).

Tamaño y forma: Los valores obtenidos para las dimensiones de las semillas a las condiciones de humedad estudiadas se muestran en la Tabla 3. Se puede observar que la longitud de las semillas presentó diferencias significativas entre las condiciones de 8,28 y 1,31 % ($p < 0,05$), mientras que la condición intermedia no fue significativamente diferente de las otras. A su vez, el ancho de las semillas a las condiciones de 8,28 y 4,62 % no fue significativamente diferente, aunque la condición de menor humedad presentó un valor significativamente más pequeño ($p < 0,05$). Finalmente, no se observaron diferencias significativas relacionadas al espesor de las semillas en el rango de humedad estudiado ($p > 0,05$).

Tabla 3. Dimensiones de las semillas de limón a los diferentes contenidos de humedad.

Contenido de humedad (b.s.) (%)	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)
8,28	11,815 ± 1,442 [b]	4,944 ± 0,729 [b]	3,929 ± 0,704 [a]
4,62	11,776 ± 1,771 [ab]	4,831 ± 0,832 [b]	3,852 ± 0,858 [a]
1,31	11,359 ± 1,502 [a]	3,997 ± 0,762 [a]	4,062 ± 1,050 [a]

*Los valores presentados son los promedios ± desviación estándar (n=100). Los promedios en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$), correspondiéndole la letra "a" al valor más chico.

Se puede observar una dependencia de la longitud y el ancho de las semillas con el contenido de humedad, indicando que la pérdida de agua de la matriz produce la reducción de al menos algunas de sus dimensiones. Este fenómeno fue demostrado en literatura para granos/semillas de cebada (Carvalho *et al.*, 2021), fenogreco (Altuntas *et al.*, 2005), melón (Obi y Offorha, 2015), hinojo (Ahmadi *et al.*, 2009), jambul (Bajpai *et al.*, 2020), neguilla (Singh *et al.*, 2015), kenaf (Izli, 2015) y *Lathyrus* (Kenghe *et al.*, 2013), entre otros. No obstante, el hecho de que no se encuentren diferencias significativas en el espesor de las semillas puede estar relacionado con la variedad de formas de las semillas y que la técnica de medición no permite cuantificar cambios considerables, debido a la presencia de rugosidad superficial.

En las Tablas 4 y 5 se señalan los parámetros geométricos calculados con las Ecuaciones 3-7 y su dependencia con la humedad.

Tabla 4. Variación del diámetro geométrico y la esfericidad de las semillas de limón con la humedad.

Contenido de humedad (b.s.) (%)	Diámetro geométrico (mm)	Esfericidad
8,28	6,089 ± 0,650 [b]	0,519 ± 0,053 [b]
4,62	5,977 ± 0,762 [b]	0,512 ± 0,059 [ab]
1,31	5,615 ± 0,733 [a]	0,498 ± 0,061 [a]

*Los valores presentados son los promedios ± desviación estándar (n=100). Los promedios en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$), correspondiéndole la letra "a" al valor más chico.

Tabla 5. Variación de la superficie proyectada y el volumen teórico de las semillas de limón con la humedad.

Contenido de humedad (b.s.) (%)	Superficie proyectada (mm^2)	Volumen teórico (mm^3)
8,28	100,853 ± 20,586 [b]	75,496 ± 23,790 [b]
4,62	97,958 ± 25,021 [b]	72,235 ± 29,230 [b]
1,31	86,832 ± 21,056 [a]	59,470 ± 22,413 [a]

*Los valores presentados son los promedios ± desviación estándar (n=100). Los promedios en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$), correspondiéndole la letra "a" al valor más chico.

El diámetro geométrico de las semillas de limón no presentó diferencias significativas en los contenidos de humedad de 8,28 y 4,62 %, mientras que sí se observaron cambios en la condición de menor humedad. Este mismo comportamiento se observó para la superficie proyectada y el volumen teórico. Sin embargo, en lo que respecta a la esfericidad se observaron cambios entre las condiciones de los extremos de humedad, a pesar de que no hubo diferencias significativas entre ellas y la condición intermedia.

La disminución de dichos parámetros con el contenido de humedad está en concordancia con los estudios previos para diversas matrices. Dependencias directamente proporcionales entre los valores de diámetro geométrico, superficie, volumen y esfericidad con la humedad fueron publicados para semillas de melón (Obi y Offorha, 2015), neguilla (Singh *et al.*, 2015) y jambul (Bajpai *et al.*, 2020). Del mismo modo, se han reportado comportamientos similares en los valores de superficie y volumen para kenaf (Izli, 2015), *Lathyrus* (Kenghe *et al.*, 2013) y fenogreco (Altuntas *et al.*, 2005). Como se mencionó anteriormente, la pérdida de agua conlleva una disminución en algunas de las dimensiones de las partículas, que se ve reflejado en los parámetros geométricos.

Propiedades gravimétricas: La Tabla 6 muestra el peso de 1000 semillas, la densidad real y la densidad y porosidad del lecho a los diferentes contenidos de humedad.

Tabla 6. Propiedades geométricas a los diferentes contenidos de humedad.

Contenido de humedad (b.s.) (%)	Peso de 1000 semillas (g)	Densidad real (g/mL)	Densidad del lecho (g/ml)	Porosidad del lecho
8,28	71,1705 ± 2,3083 ^{b}	0,8222 ± 0,0126 ^{a}	0,523 ± 0,009 ^{a}	0,364 ± 0,013 ^{a}
4,62	70,7012 ± 0,8779 ^{b}	0,8319 ± 0,0239 ^{ab}	0,532 ± 0,009 ^{a}	0,359 ± 0,034 ^{a}
1,31	64,7572 ± 1,3721 ^{a}	0,8613 ± 0,0183 ^{b}	0,525 ± 0,017 ^{a}	0,389 ± 0,032 ^{a}

*Los valores presentados son los promedios ± desviación estándar (n=3, 3, 6 y 3, respectivamente). Los promedios en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$), correspondiéndole la letra "a" al valor más chico.

Se observa que no hubo diferencias significativas en el peso de 1000 semillas a las condiciones de humedad de 8,28 y 4,62 %, y que este disminuyó a la condición de humedad restante. A pesar de que no hay suficientes datos para probar una dependencia lineal como la reportada por la mayoría de los autores, se observa una disminución del peso de las semillas con el contenido de humedad producto de su deshidratación. Este comportamiento fue publicado para granos/semillas de cebada (Carvalho *et al.*, 2021), frijol verde (Vashishth *et al.*, 2020), granada (Dak *et al.*, 2014), jambul (Bajpai *et al.*, 2020), kenaf (Izli, 2015), quinoa (Altuntas *et al.*, 2018), neguilla (Singh *et al.*, 2015), melón (Obi y Offorha, 2015), mijo (Balasubramanian y Viswanathan, 2010), hinojo (Ahmadi *et al.*, 2009), fenogreco (Altuntas *et al.*, 2005) y *Lathyrus* (Kenghe *et al.*, 2013).

En lo que respecta a la densidad real, el valor de este parámetro a la condición intermedia de humedad de las semillas no fue significativamente diferente de las condiciones extremas, pero estas sí lo fueron entre sí, indicando que la densidad aumentaba a medida que disminuye la humedad. Comportamientos similares fueron encontrados para múltiples semillas, como frijol verde (Vashishth *et al.*, 2020), kenaf (Izli, 2015), hinojo (Ahmadi *et al.*, 2009), porongo, lufa egipcia, guisantes y rábanos (Mishra *et al.*, 2019), mijo (Balasubramanian y Viswanathan, 2010), jambul (Bajpai *et al.*, 2020), *Lathyrus* (Kenghe *et al.*, 2013), amarantos (Illori y Akinyele, 2016), fenogreco (Altuntas *et al.*, 2005) y cebada (Carvalho *et al.*, 2021). La disminución del volumen debido a los cambios de humedad (Tabla 5) implica que aumente la densidad por la dependencia inversa entre la masa y el volumen de las semillas. Los valores obtenidos previamente demuestran que los cambios en el volumen de las semillas fueron relativamente mayores que los correspondientes a la masa de ellas, lo que se ve reflejado en el valor de densidad obtenido.

A pesar de que hubo cambios en el contenido de humedad, la densidad y la porosidad del lecho de las semillas de limón no presentaron diferencias significativas en las distintas condiciones ensayadas ($p > 0,05$). Es de esperar mayores valores promedio de densidad real frente a la densidad aparente, dado que este primer parámetro no tiene en consideración los intersticios vacíos del lecho. Autores como (Mishra *et al.*, 2019) y (Dak *et al.*, 2014) han indicado que tampoco se encuentran diferencias significativas entre los valores de porosidad a los diferentes contenidos de humedad, para semillas de granada y porongo, lufa egipcia, guisantes y rábanos, respectivamente. El volumen del lecho de semillas tendería a compactarse y reducirse cuando el volumen de las semillas individuales desciende producto de la deshidratación y reacomodo de las partículas, pero también hay que considerar que la rugosidad superficial podría estar parcialmente evitando que esto modifique la conformación espacial del lecho; ambas razones en conjunto justificarían que no se encuentren diferencias a las diferentes humedades.

El factor de corrección para el volumen de las semillas de limón es relevante debido a que no es posible reflejar las formas irregulares con múltiples pliegues (Figura 3) en el cálculo del volumen teórico. Relacionando los valores de volúmenes obtenidos previamente, se obtuvieron valores de factores de corrección de 0,8715 ± 0,0212 ^{b}, 0,8490 ± 0,0082 ^{b} y 0,7901 ± 0,0176 ^{a}, para los valores de humedad de 8,28, 4,62 y 1,31 %, respectivamente. Se puede observar que, a los diferentes contenidos de humedad de trabajo, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones de 8,28 y 4,62 %, mientras que sí se apreciaron cambios en la condición más seca. La deshidratación de las semillas genera una matriz más frágil y turgente, que pronuncia las rugosidades superficiales e introduce más error al calcular un volumen de forma teórica a partir de las dimensiones de las semillas.

Propiedades mecánicas: En la Tabla 7 se presentan los valores obtenidos de fuerza, deformación y energía por unidad de volumen a la rotura de las semillas de limón, para los tres niveles de humedad evaluados. Se observa que las propiedades mecánicas estudiadas presentan valores

significativamente mayores en la condición de humedad de 8,28 %, respecto de las otras.

Tabla 7. Propiedades mecánicas a los diferentes contenidos de humedad.

Contenido de humedad (b.s.) (%)	Fuerza de rotura (N)	Porcentaje de deformación a la rotura (%)	Energía (J/m^3)
8,28	48,0331 ± 22,8755 [b]	28,029 ± 12,475 [b]	426,976 ± 370,760 [b]
4,62	35,0215 ± 18,5082 [a]	19,958 ± 7,222 [a]	201,141 ± 162,129 [a]
1,31	31,0905 ± 12,7542 [a]	20,458 ± 8,535 [a]	212,274 ± 180,856 [a]

*Los valores presentados son los promedios ± desviación estándar (n=100). Los promedios en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$), correspondiéndole la letra "a" al valor más chico.

El comportamiento producido por la disminución del contenido de humedad en la fuerza de rotura difiere notablemente del reportado en bibliografía. Varios autores han demostrado que esta propiedad disminuye a medida que se incrementa el contenido de humedad en semillas de soja (Tavaloki *et al.*, 2009), sorgo (Rodrigues *et al.*, 2019), hinojo (Ahmadi *et al.*; 2009) y cártamo (Baümler *et al.,* 2006). La diferencia en el comportamiento encontrado en este trabajo respecto a estos citados puede estar relacionada con la naturaleza diferente de las semillas estudiadas, debido a que estas prevalecen dentro de una matriz con humedad relativa alta como es el interior de la fruta, y no está expuesta al ambiente como aquellos cultivos intensivos. Como se ha mencionado anteriormente, la disminución del contenido de humedad genera estructuras más frágiles propensas a quebrarse, razón por la cual se puede explicar la proporcionalidad de ese factor con la fuerza de rotura.

Por otra parte, la deformación y la energía de rotura por unidad volumétrica de las semillas al quebrarse disminuyó a medida que lo hacía el contenido de humedad. Esta tendencia es el comportamiento encontrado para la deformación en semillas de cártamo (Baümler *et al.,* 2006) e hinojo (Ahmadi *et al.*, 2009). Del mismo modo, la energía volumétrica de rotura obtenida para las semillas de soja (Tavaloki *et al.*, 2009), nueces (Altuntas y Erkol, 2009) y cártamo (Baümler *et al.,* 2006) se comportaron de forma similar a las semillas de limón del presente trabajo. Las estructuras frágiles obtenidas luego de la deshidratación son más propensas a romperse ante deformaciones importantes y es por ello que, a medida que las semillas se encuentran más secas, la deformación de la dimensión perpendicular al eje de compresión es menor. Del mismo modo, la generación de estructuras más tenaces provoca matrices donde es menor la energía requerida para romper su estructura. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo indicarían que las estructuras obtenidas en las semillas llevadas a humedades de 4,62 y 1,31 % serían similares, al menos desde el punto de vista mecánico.

4. Conclusiones

El secado de las semillas de limón permitió obtener una curva de secado, cuyos valores fueron transformados y ajustados a un modelo que explica adecuadamente el comportamiento de secado. A partir de este, se obtuvieron las cinéticas de secado que serían representativas de la contribución del germen y la cáscara, que exponen la resistencia de esta última a la transferencia de agua.

La variación del contenido de humedad resultó un factor determinante de las propiedades físicas y mecánicas de las semillas de limón. La reducción en el contenido de agua reflejó una disminución en el tamaño de las matrices, reflejándose los valores menores de longitud, ancho, superficie, volumen teórico y volumen real a la condición de humedad de 1,31 %. Del mismo modo, la disminución en el tamaño de las semillas se vio manifestado indirectamente en los valores obtenidos para la densidad real y esfericidad de las semillas a la humedad mencionada.

Por otra parte, la compactación del lecho de semillas debido a la deshidratación compensa los efectos implicados en la densidad y la porosidad del lecho, y no se encontraron diferencias significativas de estas propiedades a los diferentes valores de humedad estudiados.

En lo que refiere a las propiedades mecánicas, la generación de estructuras frágiles con la deshidratación de las semillas produjo una disminución en la fuerza de rotura, deformación y energía absorbida por unidad volumétrica a la rotura con el contenido de humedad.

A diferencia de varios de los autores citados a lo largo del trabajo, no se han presentado ajustes de los datos para explicar las tendencias de los parámetros, ya que deberían analizarse múltiples condiciones de humedad para asegurar tendencias de las propiedades físicas y mecánicas con esta condición.

Se puede concluir entonces que la condición de humedad más baja generó cambios sustanciales en la morfología y estructura de las semillas de limón. La deshidratación de semillas no solo tiene implicaciones positivas desde la generación de una

condición de humedad segura para evitar la germinación y/o el ataque de microorganismos, sino que también produce estructuras más chicas y frágiles para su posterior tratamiento.

5. Referencias

Ahmadi, H., Mollazade, K.; Khorshidi, J., Mohtasebi, S. S.; Rajabipour, A. (2009). *Some physical and mechanical properties of fennel seed (Foeniculum vulgare)*. Journal of Agricultural Science, 1(1), 66.

Ali-Khan, S. T. (1993). *Seed hull content in field pea*. Canadian Journal of Plant Science, 73(2), 611-613.

Altuntaş, E.; Özgöz, E.; Taşer, Ö. F. (2005). *Some physical properties of fenugreek (Trigonella foenum-graceum L.) seeds*. Journal of food engineering, 71(1), 37-43.

Altuntaş, E.; Erkol, M. (2011). *The effects of moisture content, compression speeds, and axes on mechanical properties of walnut cultivars*. Food and Bioprocess Technology, 4(7), 1288-1295.

Altuntaş, E.; Naneli, I.; Sakin, M. A. (2018). *Some selected engineering properties of seven genotypes in quinoa seeds.* Advances in Agricultural Science, 6(2), 36-49.

Asemu, A. M.; Habtu, N. G.; Delele, M. A.; Subramanyam, B.; Alavi, S. (2020). *Drying characteristics of maize grain in solar bubble dryer*. Journal of Food Process Engineering, 43(2), e13312.

Atteh, B.; Olukemi, O.; Adelola, O. B. (2021). *The Effects of Moisture Content Variation on Some Engineering Properties of Almond Seed (Terminalia Catappa)*. Indonesian Food Science & Technology Journal, 4(2), 45-50.

Bajpai, A.; Kumar, Y.; Singh, H.; Prabhakar, P. K.; Meghwal, M. (2020). *Effect of moisture content on the engineering properties of Jamun (Syzgium cuminii) seed*. Journal of Food Process Engineering, 43(2), e13325.

Balasubramanian, S.; Viswanathan, R. (2010). *Influence of moisture content on physical properties of minor millets*. Journal of food science and technology, *47*(3), 279-284.

Barnwal, P.; Kadam, D. M.; Singh, K. K. (2012). *Influence of moisture content on physical properties of maize*. International Agrophysics, 26(3).

Baümler, E.; Cuniberti, A.; Nolasco, S. M.; Riccobene, I. C. (2006). *Moisture dependent physical and compression properties of safflower seed.* Journal of food engineering, *72*(2), 134-140.

Carvalho, G. R.; Polachini, T. C.; Augusto, P. E. D.; Telis-Romero, J.; Bon, J. (2021). *Physical properties of barley grains at hydration and drying conditions of malt production*. Journal of Food Process Engineering, 44(4), e13644.

Carré, P.; Citeau, M.; Robin, G.; Estorges, M. (2016). *Hull content and chemical composition of whole seeds, hulls and germs in cultivars of rapeseed (Brassica napus)*. OCL, 23(3), A302.

Cihan, A.; Kahveci, K.; Hacıhafızoğlu, O. (2007). *Modelling of intermittent drying of thin layer rough rice*. Journal of food engineering, 79(1), 293-298.

Dak, M.; Jaaffrey, S. N. A.; Gupta, R. B. (2014). *Moisture-dependent physical properties of dried pomegranate arils*. Journal of Food Measurement and Characterization, 8(3), 234-240.

De Figueiredo, A. K.; Baümler, E.; Riccobene, I. C.; Nolasco, S. M. (2011). *Moisture-dependent engineering properties of sunflower seeds with different structural characteristics*. Journal of Food Engineering, 102(1), 58-65.

Dedio, W. (1982). *Variability in hull content, kernel oil content, and whole seed oil content of sunflower hybrids and parental lines*. Canadian Journal of Plant Science, 62(1), 51-54.

Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. (2014). *InfoStat versión 2014*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

El-Adawy, T. A.; El-Bedawy, A. A.; Rahma, E. H.; Gafar, A. M. (1999). *Properties of some citrus seeds. Part 3. Evaluation as a new source of protein and oil*. Food/Nahrung, 43(6), 385-391.

Fathollahi, I.; Farmani, J.; Kasaai, M. R.; Hamishehkar, H. (2021). *Some physical properties of Persian lime (Citrus Latifolia) seeds and physicochemical properties of the seed oil as affected by solvent extraction and cold pressing methods*. Journal of Food Measurement and Characterization, 15(2), 1169-1178.

Ilori, T. A.; Akinyele, O. A. (2016). *Effect of moisture content on selected engineering properties of amaranthus cruentus seed*. International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering, 6, 126-131.

IUPAC (2013). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. In International Union of Pure and Applied Chemistry by. C. Paquot (Ed.). Oxford Pergamon Press, Oxford, UK.

Izli, N. (2015). *Effect of moisture on the physical properties of three varieties of kenaf seeds*. Journal of food science and technology, 52(6), 3254-3263.

Jain, R. K.; Bal, S. (1997). *Properties of pearl millet*. Journal of agricultural engineering research, 66(2), 85-91.

Kenghe, R. N.; Nimkar, P. M.; Shirkole, S. S. (2013). *Moisture dependent physical properties of lathyrus*. Journal of food science and technology, 50(5), 856-867.

Klimek-Szczykutowicz; M., Szopa, A.; Ekiert, H. (2020). *Citrus limon (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies*. Plants, 9(1), 119.

Laura, A.; Alvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G. A. (2009). *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. John Wiley & Sons.

Malacrida, C. R.; Kimura, M.; Jorge, N. (2012). *Phytochemicals and antioxidant activity of citrus seed oils*. Food Science and Technology Research, 18(3), 399-404.

Matthaus, B.; Özcan, M. M. (2012). *Chemical evaluation of citrus seeds, an agro-industrial waste, as a new potential source of vegetable oils*. *Grasas y aceites*, *63*(3), 313-320.

Mirzabe, A. H.; Hajiahmad, A. (2021). *Physico-mechanical properties of unripe grape berries relevant in the design of juicing machine*. Journal of Food Process Engineering, e13859.

Mishra, A.; Sinha, J. P.; Kaukab, S.; Tomar, B. S. (2019). *Study of engineering properties of selected vegetable seeds*. Indian Journal of Agricultural Sciences, 89(10), 1693-1697.

Mohsenin, N. N. (1986). *Physical Properties of Plant and Animal Materials: v. 1: Physical Characteristics and Mechanical Properties*. Routledge.

Obi, O. F.; Offorha, L. C. (2015). *Moisture-dependent physical properties of melon (Citrullus colocynthis lanatus) seed and kernel relevant in bulk handling*. Cogent Food & Agriculture, 1(1), 1020743.

Pahlavani, M. H.; Abolhasani, K. (2006). *Xenia effect on seed and embryo size in cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Journal of applied genetics, 47(4), 331-335.

Pohndorf, R. S.; Rocha, J. C. D.; Lindemann, I.; Peres, W. B.; Oliveira, M. D.; Elias, M. C. (2018). *Physical properties and effective thermal diffusivity of soybean grains as a function of moisture content and broken kernels*. *Journal of Food Process* Engineering, 41(1), e12626.

Rafiei, S.; Keyhani, A.; Sharifi, M.; Jafari, A.; Mobli, H.; Tabatabaeifar, A. (2009). *Thin layer drying properties of soybean (Viliamz Cultivar).* Journal of Agriculture Science and Technology, 11, 289-300.

Rodrigues, G. B.; Resende, O.; de Oliveira, D. E.; Silva, L. C. D. M.; Junior, W. N. F. (2019). *Mechanical properties of grains sorghum subjected to compression at different moisture contents*. Journal of Agricultural Science, 11(4), 279-287.

Sharaf-Eldeen, Y. I.; Hamdy, M. Y.; Keener, H. M.; Blaisdell, J. L. (1979). *Mathematical description of drying fully exposed grains*. ASAE Paper, 79-3034.

Sharma, A. D.; Kunze, O. R.; Tolley, H. D. (1982). *Rough rice drying as a two-compartment model*. Transactions of the ASAE, 25(1), 221-0224.

Shirzadegan, M.; Röbbelen, G. (1985). *Influence of seed color and hull proportion on quality properties of seeds in Brassica napus L*. Fette, Seifen, Anstrichmittel, 87(6), 235-237.

Singh, K. K.; Goswami, T. K. (1998). *Mechanical properties of cumin seed (Cuminum cyminum Linn.) under compressive loading*. Journal of Food Engineering, 36(3), 311-321.

Singh, R. K.; Vishwakarma, R. K.; Vishal, M. K.; Singh, S. K.; Saharan, V. K. (2015). *Moisture dependent physical properties of nigella seeds*. African Journal of Agricultural Research, 10(2), 58-66.

Smaniotto, T. A. D. S.; Resende, O.; Sousa, K. A. D.; de Oliveira, D. E.; Campos, R. C. (2017). *Drying kinetics of sunflower grains*. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 21, 203-208.

Su, Y. y otros 6 autores (2021). *Effects of different moisture content and varieties on physico–mechanical properties of maize kernel and pedicel*. Journal of Food Process Engineering, 44(9), e13778.

Tavakoli, H.; Rajabipour, A.; Mohtasebi, S. S. (2009). *Moisture-dependent some engineering properties of soybean grains*. Agricultural Engineering International: CIGR Journal.

USDA (2021). *Citrus: World Markets and Trade.* Foreing Agriculture Service.

Valentas, K. J.; Rotstein, E.; Singh, R. P. (1997). *Handbook of food engineering practice*. CRC Press.

Vashishth, R.; Semwal, A. D.; Murugan, M. P.; Raj, T. G.; Sharma, G. K. (2020). *Engineering properties of horse gram (Macrotyloma uniflorum) varieties as a function of moisture content and structure of grain*. Journal of food science and technology, 57(4), 1477-1485.

32TCA - Evaluación de la extracción de compuestos desde semillas de limón: efecto de humedad y calidad de solventes.

Evaluation of compounds extraction from lemon seeds: Moisture content effect and solvents quality.

Agustín Benestante[1,2], Mayra Carolina Chalapud Narvaez[1,2], Erica Baümler[1,2], María Elena Carrín[1,2].

1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur (UNS). Av. Alem 1253, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
2. Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), CONICET - UNS. Camino "La Carrindanga" Km 7, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
   E-mail: mcarrin@plapiqui.edu.ar

Resumen
Las semillas de limón constituyen un subproducto importante de la industria de jugos en Argentina y son una materia prima atractiva para la extracción de aceite. El uso de solventes alternativos como el etanol surge como reemplazo gradual al hexano en la extracción de aceite y permite identificar a su vez otros componentes extraídos. El objetivo del trabajo fue evaluar los rendimientos de extracción total y de aceite de semillas de limón obtenidos con etanol y hexano, variando la humedad de las semillas y analizando la influencia del tipo de solvente en la capacidad extractiva del mismo. Las semillas fueron sometidas a secado hasta alcanzar tres humedades de estudio (1,31, 4,62 y 8,28 % b.s.), luego fueron molidas y su composición proximal y tamaño de partícula fueron analizados. Las extracciones se llevaron a cabo mediante un equipo Soxhlet utilizando hexanos, n-hexano, etanol 96 % y etanol absoluto como solventes. Los resultados indicaron que la humedad de las semillas no influyó en la capacidad extractiva del hexano pero sí en los solventes etanólicos, que junto con el agua contenida en el etanol, intervienen en la solubilización de material oleoso y/o de componentes de carácter hidrofílico. Las semillas de limón constituyen entonces un material de estudio interesante en la extracción de biocomponentes.

Palabras clave: rendimiento de extracción, etanol, semillas cítricas, fraccionamiento

Abstract
Lemon seeds are an important by-product of the juice industry in Argentina and they are an attractive raw material for oil extraction. The use of alternative solvents such as ethanol emerges as a gradual replacement for hexane in oil extraction and it allows to identify other extracted components. The aim of this work was to evaluate the total extraction and oil yields of lemon seeds obtained with ethanol and hexane, varying the moisture of seeds and analyzing the influence of the type of solvent on its extractive capacity. The seeds were dried until reaching three study moistures (1.31, 4.62 y 8.28 % d.b.), then they were ground and their proximal composition and particle size were analyzed. The extractions were carried out by Soxhlet using hexanes, n-hexane, ethanol 96 % and absolute ethanol as solvents. The results indicated that the extractive capacity of hexane was not influenced by the seeds moisture, while that for ethanolic solvents this capacity was affected. The moisture of seeds and the water contained in the ethanol intervened in the solubilization of lipid material and/or hydrophilic components. Therefore, lemon seeds constitute an interesting study material in the biocomponents extraction.

Keywords: extraction yield, ethanol, citric seeds, fractionation

1. Introducción

La mayor fuente de aceites vegetales son las semillas de plantas anuales que se desarrollan en climas templados y que además son fuente de proteína (O'Brien, 2008). Los componentes primarios de los aceites son los triglicéridos (compuestos por distintos ácidos grasos) y componentes minoritarios con propiedades industriales interesantes y benéficas a la salud humana como son fosfolípidos, tocoferoles, pigmentos, biofenoles, etc. La aplicación de estos aceites vegetales en diferentes industrias (farmacéutica, textil, cosmética y alimentaria) depende de su composición, rendimiento de extracción y costo (Yilmaz y Güneşer, 2017). En la actualidad, estas diferentes aplicaciones motivan a buscar y evaluar nuevas fuentes de aceite donde también se logre una caracterización completa del mismo. En este sentido, los abundantes subproductos generados en el procesamiento de cítricos resultan interesantes como nuevas fuentes de compuestos bioactivos. Los cítricos poseen un alto valor comercial en el mercado de consumo fresco y como materia prima para la industria alimentaria (Ledesma-Escobar y de Castro, 2014). En esta industria, el procesamiento de cítricos genera grandes cantidades de subproductos como cáscara, pulpa y semillas, estimándose que representan el 50% de la fruta entera procesada y constituyéndose en un severo problema ambiental (Putnik *et al.*, 2017). Estos subproductos contienen componentes naturales de alto valor como son materia grasa, azúcares, ácidos orgánicos, carbohidratos insolubles, enzimas, flavonoides, aceites esenciales y pigmentos (Boukroufa *et al.*, 2015). Las semillas de cítricos como el limón, son un subproducto principal de la industria de jugos consideradas como una fuente importante de aceite (Guneser y Yilmaz, 2017), el cual es considerado adecuado para aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, en producción cosmética, de jabones y detergentes (Yilmaz y Güneşer, 2017). El proceso de extracción de aceites vegetales posee una alta relevancia en la cantidad y en la calidad del aceite obtenido y, por tanto en su uso final (Gwatidzo *et al.*, 2017). Los aceites provenientes de las semillas de limón han sido estudiados y caracterizados fisicoquímicamente, analizando su composición de ácidos grasos, tocoferoles y esteroles (Yilmaz y Güneşer, 2017), así como también su estabilidad oxidativa, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante (Malacrida *et al.*, 2012). Es importante destacar que la composición de los aceites, así como el rendimiento logrado, dependerá, entre otras variables, del proceso y del solvente utilizado para extraerlos.

En el proceso de extracción de aceites a partir de semillas empleando solventes, el hexano es el solvente más usado y el más efectivo en la extracción industrial. Este solvente es derivado de fuentes petroquímicas, posee un punto de ebullición relativamente bajo con fácil evaporación y recuperación después del proceso de extracción y su afinidad por los lípidos es alta (Kumar *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de sus ventajas, su uso está cuestionado debido a los riesgos ambientales y en la salud humana (ECHA Classifications, 2017). Estos cuestionamientos han dado lugar a la búsqueda de solventes alternativos que permitan alcanzar la sustitución gradual en los procesos de extracción de aceite y reducir las emisiones y los efectos negativos del uso de hexano (Baümler *et al.*, 2017; Lohani *et al.*, 2015). Esta sustitución gradual se encuentra ligada a la aplicación de una "química verde" que debería llevarse a cabo con solventes alternativos que sean reconocidos como ambientalmente seguros y sean económicamente viables (Li *et al.*, 2014). En este sentido, el etanol figura como una alternativa prometedora dentro de los solventes verdes, certificado como solventes para extracción en alimentos por la Directiva 2009/32/CE del Parlamento Europeo (Perrier *et al.*, 2017). En la extracción de aceite por medio de solventes, el etanol ha sido ampliamente estudiado (Potrich *et al.*, 2020; Sawada *et al.*, 2014; Toda *et al.*, 2016; Zhuang *et al.*, 2018), siendo interesante no solo por su capacidad de extracción de aceite sino también por lograr la solubilización de otros componentes como fosfolípidos, polifenoles, pigmentos y azúcares (Baümler *et al.*, 2016, 2017). Lo anterior implica que, después del proceso de extracción, sería necesario incorporar etapas de fraccionamiento o refinamiento del extracto que permitan separar el aceite de estos componentes, pero que a su vez éstos también pueden representar un subproducto de valor agregado de interesante aplicación. En este contexto, el objetivo de este trabajo es la comparación de las extracciones de aceite y de otros componentes, realizadas con etanol y hexano variando las condiciones de humedad de las semillas de limón, como así también la evaluación del efecto de la calidad del solvente en el poder extractivo.

2. Materiales y métodos

Preparación de la muestra

Limones (Citrus lemon variedad *Eureka*) fueron obtenidos de un local comercial. Las semillas de limón fueron cuidadosamente separadas de la cáscara y de la pulpa, lavadas y sometidas a secado en una estufa de aire forzado a una temperatura promedio de 55 °C hasta alcanzar, en

un valor aproximado, tres humedades de estudio: la condición más seca alcanzable (M1), una condición comúnmente recomendada como segura para su almacenamiento (M3) y una condición intermedia entre ambas (M2). La humedad final de cada conjunto de semillas fue determinada en una estufa de vacío (60°C, 20 inHg) de acuerdo con la norma IUPAC 1.121 (IUPAC, 2013). Cada grupo de semillas fue almacenado en recipientes herméticos protegidos de la luz y en condiciones de refrigeración hasta su uso. Previo a la extracción, las semillas fueron atemperadas a condición ambiental y molidas en un molinillo de acero (Battaglia S.R.L., Argentina) a máxima velocidad en 2 pulsos de 10 s cada uno, de forma tal de asegurar que el tamaño de partícula fue menor a 3000 μm (confirmado por tamizado).

Caracterización química proximal de las semillas

Semillas del grupo M1 caracterizadas en contenido de aceite mediante extracción en Soxhlet con n-hexano de acuerdo con la norma IUPAC 1.122 (IUPAC, 2013). El contenido de proteína bruta fue llevado a cabo por la técnica Kjeldahl para determinación de nitrógeno total de acuerdo con el método 984.13 (AOAC, 2000) con conversión a proteína bruta a través del factor de conversión de 6,25. El contenido de fibra detergente neutra fue determinado por el método secuencial de Van Soest *et al.* (1991) y el contenido de cenizas por calcinación en mufla por el método Ba 5a-49 (AOCS, 2009). El contenido de carbohidratos se obtuvo por diferencia entre el peso de muestra seca y la suma de los contenidos correspondientes de aceite, proteína bruta, fibra detergente neutra y cenizas.

Ensayos de extracción

Las semillas de limón fueron sometidas a extracción en un equipo Soxhlet según norma IUPAC 1.122 (IUPAC, 2013) empleando cuatro solventes: hexanos (Dorwill, calidad analítica), etanol 96 % (Porta, calidad medicinal), n-hexano (Anedra, pureza 99,5 %) y etanol absoluto (Dorwill, pureza 99,5 %). Las muestras M2 y M3 fueron sometidas a extracción con los dos primeros, mientras que los cuatro solventes fueron ensayados con M1. Aproximadamente 10 g de semillas molidas fueron colocadas en un cartucho de papel de filtro tipo Whatman N°4 y el material fue extraído con una relación 20:1 solvente:muestra por 6 h a presión atmosférica. Las extracciones fueron realizadas por triplicado.

Después de la extracción, cada muestra fue filtrada con papel Whatman N° 4 y llevada a otro balón previamente pesado. Con el fin de remover el solvente, las muestras extraídas con hexanos y n-hexano fueron sometidas a rotaevaporación (Buchi, Suiza) a presión reducida (60 °C) y el solvente residual fue eliminado bajo corriente de nitrógeno hasta peso constante. El procesamiento de las muestras extraídas con etanol 96 % y etanol absoluto se realizó de acuerdo al procedimiento reportado previamente por Otero *et al.* (2016) con algunas modificaciones menores. Los extractos etanólicos fueron parcialmente desolventizados usando un rotaevaporador (presión reducida, 60°C) y luego fraccionados por separación líquido-líquido mediante 10 ciclos consecutivos de lavado con hexano y centrifugado, logrando la separación de dos fracciones: 1) material soluble en hexano (MSH) correspondiente a la fase superior y 2) material insoluble en hexano (MIH), que corresponde a la fase inferior y contiene el material extraído junto con el aceite. Cada fracción fue colocada en frascos previamente pesados y mantenida bajo corriente de nitrógeno hasta eliminar los solventes. La fracción que contenía MIH fue liofilizada (RIFICOR, Argentina) con el fin de remover el agua residual. Tanto la fracción de MSH, que corresponde a lo comúnmente denominado aceite extraído, como la fracción MIH fueron obtenidas por gravimetría. El rendimiento de extracción de cada una de estas fracciones (i), R_i, se calculó en función del peso de semillas (en base seca, b.s.) inicialmente sometido a extracción mediante la siguiente ecuación:

$$R_i\ (\%) = \frac{Peso\ fracción\ i\ (g)}{Peso\ muestra\ b.s.(g)} x\ 100 \qquad (1)$$

Distribución de tamaño de partículas

La distribución de tamaño de las semillas molidas desgrasadas con hexanos fue determinada con un analizador de tamaño de partículas por difracción de láser Horiba LA - 950 V2 (Horiba Ltd., Japón), análisis que considera a las partículas como esféricas. Las muestras molidas desgrasadas fueron almacenadas en sobres de papel aluminio para evitar la incorporación de humedad atmosférica. La distribución de tamaño de las semillas molidas desgrasadas con hexanos fue determinada con un analizador de tamaño de partículas por difracción de láser Horiba LA - 950 V2 (Horiba Ltd., Japón), análisis que considera a las partículas como esféricas. Las muestras molidas desgrasadas fueron almacenadas en sobres de papel aluminio para evitar la incorporación de humedad atmosférica. Previo a la medición, las muestras fueron pasadas por una malla de 1000 μm y el pasante fue medido en

condición seca con aire, un vacío de 0,2 MPa y un 95 % de vibración del alimentador. Los valores fueron obtenidos por triplicado para cada condición de humedad

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron realizando ANOVA y test de Fisher (α=0,05), usando el software para análisis estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011). Los resultados se presentan como el valor promedio ± desvío estándar, con n=3 en todas las determinaciones.

3. Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se presentan los resultados de contenido de humedad de cada grupo de semillas acondicionado para proceder a las extracciones con los diferentes solventes seleccionados. Como se observa, los tres grupos de muestras son diferentes estadísticamente, por lo que se utilizarán para evaluar el efecto de la humedad de las semillas en cada caso, más allá de la humedad del solvente (como sería el caso con etanol 96 %).

Tabla 1. Contenido de humedad de las semillas de limón acondicionadas para ser sometidas a extracción en Soxhlet.

Muestra	Humedad (% b.s.)
M1	1,3063 ± 0,1006 [a]
M2	4,6207 ± 0,2514 [b]
M3	8,2820 ± 0,2567 [c]

Valores en la misma columna seguidos por diferentes letras son significativamente diferentes (p < 0,05) por test de Fisher.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis proximal de las semillas, previamente deshidratadas (M1). El contenido de aceite resultó menor al reportado por Costa *et al.* (2018), El-Adawy *et al.* (1999), Yilmaz y Güneşer (2017), Malacrida *et al.* (2012), Matthaus y Özcan (2012) y Slama *et al.* (2020), pero similar al indicado por Gölükcü *et al.* (2016). Las diferencias están ampliamente justificadas por tratarse de muestras vegetales, no solo obtenidas de distinta variedad de limón y con contenidos de humedad inicial diferentes, sino también producidas en distinta época y localización.

Tabla 2. Composición proximal de las semillas de limón M1.

Componente	Contenido (% b.s.)
Humedad y material volátil	1,31 ± 0,10
Aceite	27,24 ± 0,59
Proteína bruta	18,63 ± 0,08
Fibra detergente neutra	37,26 ± 0,27
Cenizas	3,67 ± 0,12
Carbohidratos	11,90 ± 0,31

En la Figura 1 se muestra el rendimiento de MSH extraído de M1 usando los cuatro solventes mencionados. No se encontraron diferencias significativas (p > 0,05) entre los valores de MSH extraído a partir de las semillas con la condición más seca alcanzable (M1) con tres de los solventes estudiados (etanol absoluto, n-hexano y hexanos), pudiéndose entonces reportar un rendimiento de extracción de aceite de 28,03 ± 0,87 % (b.s.) como un promedio entre los tres solventes mencionados. El comportamiento encontrado es similar al reportado por Otero *et al.* (2016), quienes encontraron valores similares de rendimiento de aceite estudiando el uso de hexanos y etanol absoluto durante la extracción de aceite de expandidos de soja. Más aún, Zhuang *et al.* (2018) no encontraron un efecto significativo en el rendimiento de aceite extraído con n-hexano y etanol absoluto a partir de granos de *Litsea cubeba*; concluyendo que los dos solventes poseen capacidades similares para extraer material lipídico. Sin embargo, Costa *et al.* (2018) reportaron rendimientos de extracción de aceite superiores para semillas de limón secas cuando se utilizó n-hexano en lugar de etanol absoluto.

Por otro lado, los resultados muestran que el etanol 96 % fue capaz de extraer mayor porcentaje de MSH en las muestras M1 (Figura 1), indicando que la presencia de agua en el solvente favorecería la disponibilidad y extractabilidad de los compuestos que luego tienen preferencia por permanecer en la fase hexano. Baümler *et al.* (2016) encontraron valores similares de rendimiento de aceite estudiando el uso de etanol (95 %) y n-hexano como solventes de extracción de aceite desde collets de girasol (contenido de humedad 6 %, b.s.). Las diferencias reportadas en el comportamiento de los solventes en matrices vegetales pueden estar dadas no solo por las variaciones en la estructura y composición de dichas matrices, sino también por el efecto de la humedad de las mismas.

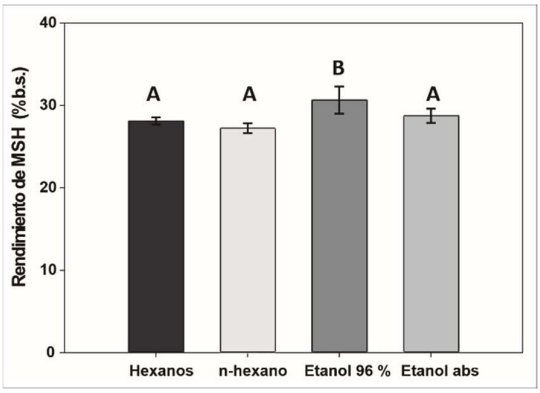


Figura 1. Rendimiento de MSH para los diferentes solventes (% b.s.) en semillas M1. Valores en letras diferentes en las barras son significativamente diferentes (p < 0,05) por test de Fisher.

En la Figura 2 se observan los rendimientos totales (RT) obtenidos de la extracción de las muestras M1 utilizando hexanos, n-hexano, etanol 96 % y etanol absoluto. Diferencias significativas fueron encontradas entre los RT ($p < 0,05$), obteniéndose valores significativamente más bajos usando hexanos y n-hexano (solventes no polares) (RT promedio = 27,68 ± 0,67 % b.s.) que los conseguidos con los solventes etanólicos. Lo anterior evidencia que las dos clases de solventes alcohólicos (etanol absoluto y etanol 96 %) tienen la capacidad de extraer, simultáneamente con el aceite, otros componentes como podrían ser fosfátidos (más allá de los extraíbles con solventes no polares), polifenoles, pigmentos y azúcares solubles (Baümler *et al.*, 2016) como así también proteínas (Sawada *et al.*, 2014; Toda *et al.*, 2016), debido a su mayor polaridad y a la menor selectividad del etanol hacia los triglicéridos. Por lo tanto, el fraccionamiento del extracto etanólico resultante es una etapa fundamental dada la alta difusión de tocoferoles, fosfolípidos y azúcares en la fracción MIH (Baümler *et al.*, 2017; Otero *et al.*, 2016).

Comparando la extracción obtenida con los dos solventes etanólicos en M1 (Figura 2), se obtuvo un RT significativamente mayor usando etanol 96 % ($p < 0,05$). La diferencia principalmente radica en la extracción de mayor porcentaje de MIH (7,71 ± 0,53 % g MIH/g semilla b.s.) por parte del etanol 96 % comparado con el obtenido con etanol absoluto (5,85 ± 0,36), comprendiendo el 20,10 ± 0,87 y 16,90 ± 0,73 % del total extraído, respectivamente. Por lo tanto, se puede afirmar que el mayor porcentaje de agua contenida en el solvente etanol 96 % interviene de manera fundamental en la extracción, logrando una mayor solubilización de componentes afines (hidrofílicos), incrementando así el rendimiento total, además de permitir una mayor extracción de compuestos que finalmente se recuperan en la fase MSH.

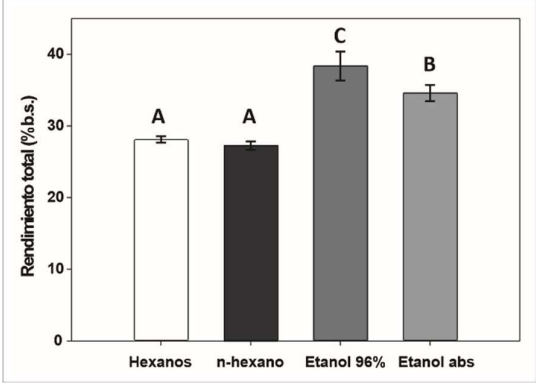


Figura 2. Rendimiento total en M1. Valores en letras diferentes en las barras son significativamente diferentes (p < 0,05) por test de Fisher.

En la Figura 3 se muestran los porcentajes de extracción de M1, M2 y M3 usando hexanos y etanol 96 %. El total extraído por hexanos corresponde, como su nombre lo indica, al MSH; sin embargo, el total extraído por etanol corresponde a la sumatoria de las dos fracciones separadas luego de la extracción, MSH y MIH. Al comparar estadísticamente los rendimientos de material lipídico extraído (MSH) con hexanos y etanol 96 % se observa que la capacidad extractiva del hexano no se vio afectada por el aumento en la humedad de las semillas; además, los valores de extracción del material lipídico con etanol en M2 y M3 fueron similares a los anteriores (sin mostrar diferencias estadísticas significativas, $p > 0,05$), por lo que se puede reportar un rendimiento de MSH general para estos 5 casos de 27,94 ± 0,57 % (b.s.) que resulta levemente menor (pero estadísticamente diferente) al obtenido desde M1 usando etanol 96 % como solvente de extracción (30,65 ± 1,65 % b.s.). Sin embargo, cuando se analiza el rendimiento de extracción de MIH, se observa que los mismos resultan similares para M1 y M2 (en promedio, 8,19 ± 0,87 % b.s.), pero significativamente menores que el obtenido con M3. Esto indica que la presencia de mayor humedad en las semillas también tiene influencia en la extracción etanólica, en este caso disminuyendo la capacidad del solvente para extraer material oleoso o de carácter más hidrofóbico (cuando se pasa de M1 a M2 y M3) como también aumentando su capacidad de extraer otros compuestos con carácter más hidrofílico (que posteriormente conforman MIH). Por lo tanto, puede inferirse que el proceso general de extracción con solvente etanólico estaría siendo afectado no solo por la disolución afectiva de material (de distinto carácter hidrofílico e hidrofóbico) sino también por efectos de lavado o arrastre de compuestos, que pueden darse por cambios conformacionales de las estructuras internas del sólido por la presencia/ausencia de agua o el desbloqueo físico de los sitios ocupados por MSH.

En concordancia con esto, los porcentajes de extracción de MSH, respecto a lo total extraído (MSH+MIH), resultaron en valores de 79,90 ± 0,87, 75,72 ± 1,67 y 71,47 ± 2,37 % para las muestras M1, M2 y M3 respectivamente, dejando en evidencia que la elección de las condiciones de trabajo deberá depender del objetivo particular del proceso extractivo: maximizar MSH, MIH o RT, lo que también está directamente relacionado con la recuperación de harinas de distinta calidad.

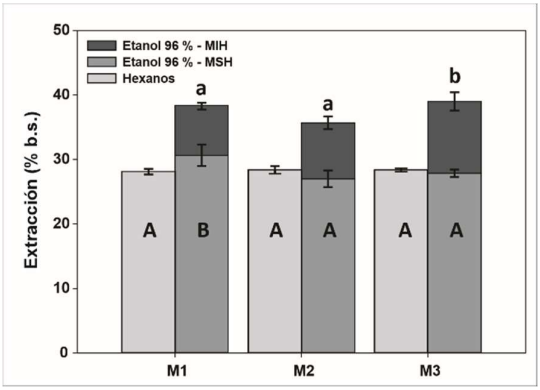


Figura 3. Porcentajes de extracción con hexanos y etanol 96 % de cada muestra de semillas (según Tabla 1). Letras mayúsculas en las barras indican la comparación entre MSH: Material soluble en hexano; letras minúsculas en las barras indican la comparación entre los MIH: Material insoluble en hexano. En cada caso, letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05) por test de Fisher.

La distribución de tamaño de partículas de las muestras desengrasadas se muestra en la Figura 4 a los diferentes contenidos de humedad, en escala logarítmica. El solapamiento de las curvas para M2 y M3 indica que las muestras con contenidos de humedad de 4,62 y 8,28 % respectivamente, tuvieron poblaciones de partículas de similar tamaño. No obstante, la ubicación de ambas curvas por encima de la que corresponde a M1, a mayores valores de diámetro de partícula, muestran la presencia de mayor cantidad de partículas más grandes en las condiciones intermedia y superior de humedad. Por otra parte, la ubicación de la curva de M1 sobre las otras dos en la primera zona indica la presencia de mayor porcentaje de partículas más pequeñas en la condición de humedad de 1,31 %. A medida que aumenta el diámetro de las partículas, se observa que la muestra desengrasada en esta última condición contiene una menor población respecto a las condiciones más húmedas, hasta alcanzar un pico alrededor de las 500 µm.

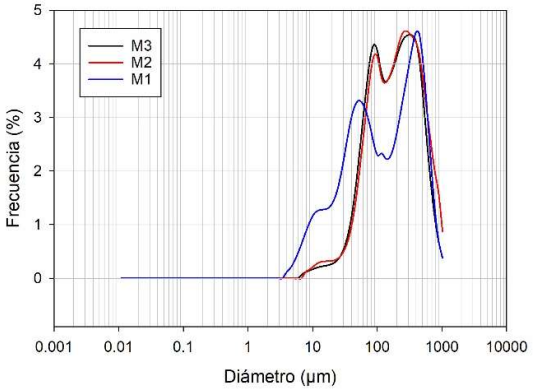


Figura 4. Distribución de tamaño de partículas para los diferentes contenidos de humedad.

En la Figura 5, las curvas M2 y M3 de frecuencia acumulada para las condiciones de humedad de 8,28 y 4,62 % se superponen para el espectro de diámetro estudiado indicando que el efecto de la humedad sobre la molienda de las semillas fue similar desde el punto de vista de la población obtenida. Así, no obstante, se distingue una pequeña separación en los valores acumulados al diámetro de corte de 1000 µm, alcanzando un valor de 82,84 y 85,27 % para M3 y M2, respectivamente. Por otro lado, la curva de frecuencia acumulada para M1 se mantiene por encima de las correspondientes a M2 y M3 en todo el rango de diámetros analizados (luego de separar las partículas con tamiz de 1000 µm) y asimismo alcanza un valor mayor, respecto a lo logrado con M2 y M3, al valor de diámetro de corte obtenido por tamizado. Entonces, puede asegurarse que la población obtenida luego de moler las semillas a la condición más seca de humedad presentó partículas más finas.

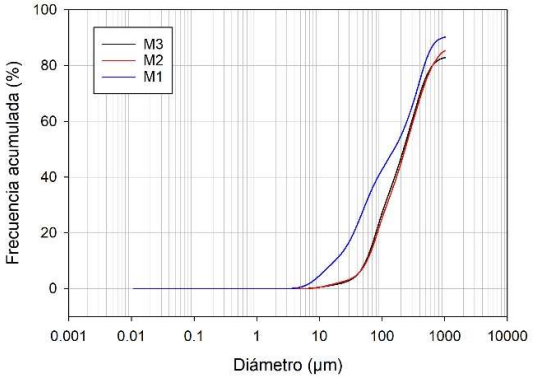


Figura 5. Frecuencia acumulada de las muestras desengrasadas en función del diámetro de partícula para los diferentes contenidos de humedad.

El contenido de humedad de las semillas tiene influencia directa en el proceso de molienda. La presencia de agua en la matriz actúa como plastificante, de modo que dificulta la molienda y

se obtienen muestras con valores promedios y distribución de tamaño de partículas mayores frente a aquellas con menor contenido de humedad. El comportamiento obtenido demuestra la escasa presencia de agua, que aumenta la fragilidad del material y permite romper fácilmente las matrices y obtener polvos más finos (Jung *et al.*, 2018).

Cabe destacar que la presencia de partículas más finas aumenta la superficie expuesta del material a extraer, lo que podría aumentar los rendimientos de extracción. No obstante, por su bajo peso y las cargas estáticas sobre su superficie, tienden a aglomerarse y compactar el lecho de extracción. Es por ello que la presencia de partículas de mayor tamaño, como pueden ser de la cáscara, favorecen la percolación del solvente, aumentando la porosidad del lecho y evitando la canalización durante la extracción (Matthaus y Özcan, 2012). La acción de estos factores en simultáneo puede explicar el hecho de que no se encuentren diferencias significativas en los rendimientos de aceite extraído con hexano a los contenidos de humedad estudiados. Del mismo modo, se podría inferir que las diferencias en los rendimientos totales se verían mayormente afectados por la elección del solvente y no por el tamaño de la población de partículas.

4. Conclusiones

La extracción de componentes de un subproducto generado a gran escala en Argentina como son las semillas de limón, permitió evidenciar diferencias en la capacidad extractiva de hexano y de etanol, no solo respecto a su calidad sino también al contenido de agua presente en las semillas. Con la extracción etanólica, otros componentes afines e hidrofílicos, aparte del material lipídico, logran difundir hacia el solvente. En la muestra de semillas con la condición más seca alcanzable (M1), la extracción de MSH y MIH fue lograda en mayor proporción por el etanol 96 %, posiblemente debido a la presencia de agua que contribuyó a la extractabilidad de componentes de carácter hidrofóbico e hidrofílico. Por su parte, la humedad de las semillas no influyó en la capacidad extractiva del hexano, pero sí cuando se usó etanol 96 % dado que, para las semillas en la condición de humedad más alta, la extracción de MIH se incrementó. Por lo tanto, la clase y la calidad del solvente, además de la estructura y composición de matrices vegetales como las semillas de limón tienen un efecto significativo en los procesos de extracción de componentes y su conocimiento es un punto importante para determinar la calidad del material extraído y su rendimiento.

A su vez, la desecación de las semillas generó una estructura más frágil que favoreció la molienda de las mismas, permitiendo así obtener polvos con partículas más finas como se ve reflejado en los parámetros de tamaño de partícula. Esto permite obtener una superficie expuesta mayor, lo que favorece la extracción con solventes de compuestos de la matriz.

Ambientalmente, la valorización de un subproducto de la industria alimentaria como son las semillas de limón tiene una contribución significativa desde el punto de vista ambiental. El conocimiento en la caracterización de las semillas y en las variables del proceso de extracción de sus componentes tiene un valor altamente relevante en la búsqueda de nuevas fuentes de aceite y de compuestos interesantes con propiedades benéficas para la salud humana.

5. Referencias

AOAC. (2000). *Association of Official Analytical Chemists*. In Association of Official Analytical Chemists. 14th.W. Horwitz, A. Senzel, H. Reynolds & D. Park (Ed.). Arlington, VA, USA

AOCS. (2009).D. Firestone (Ed.). 6th. Champaign, Illinois, USA, AOCS Press

Baümler, E. R. y otros autores. (2016). *Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent*. Journal of Food Engineering*, 178*, 190-197.

Baümler, E. R. y otros autores. (2017). *Diffusion of tocopherols, phospholipids and sugars during oil extraction from sunflower collets using ethanol as solvent*. Journal of Food Engineering*, 194*, 1-8.

Boukroufa, M. y otros autores. (2015). *Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin*. Ultrasonics Sonochemistry*, 24*, 72-79.

Costa, G. y otros autores. (2018). Caracterización química de semillas de limón y mandarina y su aceite. In *Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP 2018.* Resumen publicado en Memorias del congreso, pg 146, ISBN 978-987-46333-1-6.

Di Rienzo, J. A. y otros autores. (2011). *InfoStat versión 2011*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad

Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar, 195-199.

ECHA Classifications. (2017). Substance Evaluation Conlcusion as required by REACH Article 48 and Evaluation Report for n-Hexane. In *European Chemicals Agency. https://echa.europa.eu/documents/10162/13628/SEV-203-777-6-1_CONCLUSION_AND_REPORT_public_15296_en.pdf/9ec3d80b-452f-08d6-bfdc-d55d2c05118a*.

El-Adawy, T. y otros autores. (1999). *Properties of some citrus seeds. Part 3. Evaluation as a new source of protein and oil*. Food/Nahrung*, 43* (6), 385-391.

Gölükcü, M. y otros autores. (2016). *The effect of harvesting time on seed oil content and fatty acid composition of some lemon and mandarin cultivars grown in Turkey*. Journal of Agricultural Sciences*, 22* (4), 566-575.

Guneser, B. A.; Yilmaz, E. (2017). *Bioactives, Aromatics and Sensory Properties of Cold-Pressed and Hexane-Extracted Lemon (Citrus Limon L.) Seed Oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94* (5), 723-731.

Gwatidzo, L. y otros autores. (2017). *Influence of extraction method on yield, physicochemical properties and tocopherol content of manketti (Schinziophyton rautanenii) nut oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94* (7), 973-980.

IUPAC. (2013). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. In International Union of Pure and Applied Chemistry.C. Paquot (Ed.). Oxford Pergamon Press, Oxford, UK

Jung, H. y otros autores. (2018). *Effect of moisture content on the grinding process and powder properties in food: A review*. Processes*, 6* (6), 69.

Kumar, S. J. y otros autores. (2017). *Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds*. Chemistry Central Journal*, 11* (1), 1-7.

Ledesma-Escobar, C. A.; de Castro, M. D. L. (2014). *Towards a comprehensive exploitation of citrus*. Trends in Food Science & Technology*, 39* (1), 63-75.

Li, Y. y otros autores. (2014). *Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds*. Comptes Rendus Chimie*, 17* (3), 242-251.

Lohani, U. C. y otros autores. (2015). *Comparison of ethyl acetate with hexane for oil extraction from various oilseeds*. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92* (5), 743-754.

Malacrida, C. R. y otros autores. (2012). *Phytochemicals and antioxidant activity of citrus seed oils*. Food Science and Technology Research*, 18* (3), 399-404.

Matthaus, B.; Özcan, M. (2012). *Chemical evaluation of citrus seeds, an agro-industrial waste, as a new potential source of vegetable oils*. Grasas y Aceites*, 63* (3), 313-320.

O'Brien, R. D. (2008). *Fats and oils: formulating and processing for applications*: CRC press.

Otero, N. y otros autores. (2016). Cinética de la extracción etanólica del aceite de soja. In V. Rosati, A. León & C. Robledo (Eds.), *Calidad tecnológica de los alimentos: trabajos completos. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016*. ISBN 978-987-45380-4-8. Córdoba, Argentina.

Perrier, A. y otros autores. (2017). *Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes*. Ultrasonics sonochemistry*, 39*, 58-65.

Potrich, E. y otros autores. (2020). *Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis*. Journal of Cleaner Production*, 244*, 118660.

Putnik, P. y otros autores. (2017). *Innovative "green" and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes—A review*. Molecules*, 22* (5), 680.

Sawada, M. M. y otros autores. (2014). *Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal*. Food Research International*, 62*, 662-670.

Slama, A. y otros autores. (2020). *Valorisation of oils extracted from four Tunisian citrus species seeds*. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 97* (3), 47-54.

Toda, T. A. y otros autores. (2016). *Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent:*

Experimental data and modeling. Food and Bioproducts Processing*, 98*, 1-10.

Van Soest, P. v. y otros autores. (1991). *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition*. Journal of Dairy Science*, 74* (10), 3583-3597.

Yilmaz, E.; Güneşer, B. A. (2017). *Cold pressed versus solvent extracted lemon (Citrus limon L.) seed oils: yield and properties*. Journal of Food Science and Technology*, 54* (7), 1891-1900.

Zhuang, X. y otros autores. (2018). *The effect of alternative solvents to n-hexane on the green extraction of Litsea cubeba kernel oils as new oil sources*. Industrial Crops and Products*, 126*, 340-346.

33TCA - Validación del método de la elipse que mejor ajusta para la determinación de las dimensiones de granos y semillas con ImageJ®.

Validation of the best fits ellipse method for the determination of the dimensions of grains and seeds with ImageJ®.

Mario S Cleva, Diego O. Liska, Amadeo R. Goitia, Joaquín O. Rojas, Martín Azcoaga.

1. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Resistencia. Centro de Investigación en Tecnologías de la Información y Comunicación (CInApTIC). .clevamario@hotmail.com.

Resumen

Se presenta en este trabajo una validación del método de la elipse que mejor ajusta para la determinación de las dimensiones de granos de soja, maíz, maní y girasol empleando Procesamiento Digital de Imágenes (PDI) caracterizada por su bajo costo, rapidez y precisión. Las muestras constan de 50 granos enteros de cada clase. Se determinan las longitudes del largo y ancho de cada grano con calibres digitales y analógicos. Posteriormente, las imágenes de las muestras se digitalizan con dos dispositivos diferentes (cámara digital de celular y escáner de escritorio) y se procesan con ImageJ® para obtener la longitud de los ejes de la elipse que mejor ajusta. Se calcula la desviación relativa porcentual (DRP) entre los valores obtenidos por PDI y lo obtenidos con calibre. En promedio, cuando se emplea el escáner, la DRP es del orden del 1.5% para el caso del eje mayor y del 1.9% para el eje menor. Con cámara digital, las DRP tienden a duplicarse: 3.2% para el primero y 3.4% para el segundo. Los resultados presentados, validan el empleo de la elipse que mejor ajusta para la determinación de la longitud y ancho de granos y semillas y pueden ser extendidas a otras variedades.

Palabras clave: calibre – escáner – medición – oleaginosas.

Abstract

A validation of the best fits ellipse method for the determination of the dimensions of soybeans, corn, peanuts and sunflower using Digital Image Processing (DPI) characterized by its low cost, speed and precision is presented in this work. The samples consist of 50 whole grains of each kind. The lengths and widths of each grain are determined with digital and analog calipers. Subsequently, the images of the samples are digitized with two different devices (digital cell phone camera and desktop scanner) and processed with ImageJ® to obtain the length of the ellipse axes that best fits. The relative percentage deviation (RPD) between the values obtained by DPI and those obtained with caliper is calculated. On average, when the scanner is used, the RDP is of the order of 1.5% for the case of the major axis and 1.9% for the minor axis. With a digital camera, RDPs tend to double: 3.2% for the former and 3.4% for the latter. The results presented validate the use of the best fits ellipse method to determine the length and width of grains and seeds and can be extended to other varieties.

Keywords: caliper – scanner – measurement – oilseeds.

1. Introducción

Los métodos de evaluación y clasificación de la calidad de alimentos son procesos rutinarios, encuadrados por normativas propias de cada país. Es importante que estos métodos puedan conducir a una determinación objetiva, precisa y rápida, y es deseable que tengan bajo costo de implementación. Sus mejoras, influenciadas por aspectos tecnológicos, no deben alterar los procedimientos mencionados en dichas normas para asegurar su implementación. De acuerdo a estas normas, los granos y semillas para el consumo humano tienen límites de tolerancia a defectos que son bajos. Los responsables de la determinación de la calidad son organismos privados y estatales quienes a través de expertos certifican la calidad mediante diferentes procedimientos de inspección. Estas verificaciones se realizan en diferentes etapas que van desde el origen de la semilla hasta la puesta del producto en las góndolas para su consumo. El experto realiza una inspección visual de cada grano de una muestra (cuya forma de obtención se realiza siguiendo un protocolo) con la finalidad de clasificarlos, según características vinculadas con su morfología y aspecto. Estas características, en el caso de nuestro país, están definidas por resoluciones específicas del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

Varios aspectos que permiten clasificar la calidad de los granos, tienen que ver con la morfología del mismo, la cual se puede determinar a partir de las medidas de sus dimensiones. El empleo del calibre para estas determinaciones suele ser un proceso complicado y tedioso, sobre todo si los granos son pequeños o difíciles de manipular. Para reducir los errores asociados a este tipo de proceso se requiere de una metodología más sencilla para la determinación de las medidas necesarias, como aquellas que emplean Procesamiento Digital de Imágenes (PDI). Los algoritmos de PDI aplicados al estudio de semillas y granos, permiten obtener información del tamaño y parámetros de forma a partir de su imagen. Las determinaciones de estos valores son importantes no sólo en la determinación de la calidad, sino también para el diseño de equipamiento para procesamiento, transporte, ordenamiento, separación y almacenamiento.

Se han propuesto diferentes métodos para la determinación de las dimensiones en granos y semillas. Mirzabe y col. (2012) calculan algunas propiedades físicas de tres variedades de semillas de girasol como ser la longitud, el ancho, el grosor, la masa de las semillas individuales y la masa de 1000 semillas. Calculan las propiedades de la forma, incluyendo el diámetro medio geométrico, la esfericidad, el área de la superficie, el área proyectada y el volumen de las semillas. Calculan índices estadísticos para parámetros dimensionales y de forma. Hemender y col. (2018) mencionan que el análisis de imágenes es una técnica de vanguardia para las pruebas de calidad de semillas de girasol. Permite la evaluación de varias características fisiológicas y morfológicas de la semilla. Son rápidos, con rentabilidad y de naturaleza automática, y el entorno de trabajo fácil de usar sobre otras técnicas convencionales. También permiten su aplicación en diferentes campos de la investigación en ciencias de semillas, como estudios de germinación, estimación de vigor, identificación de variedades y pruebas de pureza, etc., Yuanyuan y col. (2016) analizan la forma de los granos de maíz para identificar las semillas de mejor calidad para siembra. Aplican la técnica de Otsu de binarización, y detección de bordes para extraer la morfología del grano, y con la técnica de Matriz de Vector de Soporte (SVM), clasifican en aptos y no aptos. Se comparan tres funciones kernel para el método SVM: lineal, polinomial y radial. La radial permite obtener mayor precisión en la clasificación de las semillas. Boldor y col. (2002) presentan un método por procesamiento de imágenes obtenidas de maní en las cuales determinan el color de la cobertura usando el método de análisis de madurez de la cáscara. El mismo sistema también permite determinar el tamaño de los granos con una precisión de 0,1 mm. Vasishth y Bavarva (2015) presentan un método que emplea una cinta transportadora, y un procesador de placa única (Raspberry Pi) conectado a una cámara, para clasificar granos de maní basados en aspectos morfológicos y de color. El sistema es económico, permite reconocer materia extraña y granos defectuosos, y su capacidad de procesamiento es de 43,2 kg/h. Shahin y col. (2005) presentan un método para granos de soja, para reemplazar la medición del tamaño de las semillas con cribado (tamizado), por el análisis de imágenes. El tiempo se reduce de 10 min (tamiz) a 30 segundos (análisis de imágenes). El cribado mecánico puede dar lugar a daños involuntarios, mientras que el análisis de imágenes es no-destructivo. La aportación consiste en que procesa N semillas al mismo tiempo, siempre que las mismas estén en un mismo plano, y que el espesor de la capa de la muestra sea de 1 semilla. El error máximo obtenido es del orden del 3%. Namías y col. (2012) proponen un sistema de bajo costo para procesar granos de soja, utilizando un escáner comercial. Demuestran que las características morfológicas tienen poco poder discriminante, y las mediciones sobre distribución de color proporciona buena separación de los grados

de las semillas. En este trabajo se determinan 10 descriptores morfológicos (perímetro, área, elongación, etc.), y 28 descriptores de color (promedio, variancia, covariancia, etc.). Se utiliza OpenCV para la morfología, y para la clasificación, máquinas de soporte de vector SVM, Random Forest y validación cruzada (10 iteraciones). Como resultado, se obtiene un 95% de precisión de identificación en soja sana, y un 70% de precisión en los otros tipos de soja (dañados). Momin y col. (2017) utilizan un escáner de doble iluminación, frontal y retro iluminación para analizar granos de soja, utilizando una transformación de espacio de color de RGB a HSI (matiz, saturación, intensidad). En este trabajo, las técnicas PDI utilizadas son 9 funciones principales de la biblioteca OpenCV. Van Dalen (2004) determinó la distribución de las longitudes de los granos de arroz de una muestra a partir de la aplicación de algoritmos de PDI a la imagen digital de los mismos. Cleva y col. (2013) presentan un método para la determinación del volumen en granos de arroz por PDI. En este método se trabaja con la imagen de la muestra de los granos de arroz, que es obtenida con un escáner de escritorio y se propone un modelo para determinar el volumen del grano de arroz empleando las longitudes de los ejes de la elipse que mejor ajusta al área proyectada del grano,

En este trabajo se propone el empleo de la determinación de los ejes de la elipse que mejor ajusta al área proyectada del grano. Este algoritmo consiste en obtener una elipse cuyos momentos de segundo orden principales son iguales a los del objeto que se encuentra en la imagen y cuyas dimensiones se quieren obtener. De esta elipse se obtienen sus ejes que constituyen una aproximación del largo y ancho del objeto. Para obtener esta elipse se emplea el software de código abierto ImageJ®.

A fin de validar el método propuesto se realizan determinaciones de la longitud y ancho de una muestra de 50 granos de maíz y cantidades análogas de maní, soja y girasol. Se comparan los valores obtenidos de los ejes de la elipse que mejor ajusta a partir de imágenes obtenidas por una cámara digital de un celular y un escáner y se contrastan con los obtenidos con un calibre. Cada muestra es procesada por al menos dos personas.

2. Materiales y métodos

Se seleccionan 50 granos enteros de: maíz y las mismas cantidades de granos de maní, soja y girasol, los cuales fueron extraídos de paquetes comerciales.

Se determinan la longitud y ancho de cada grano de las cuatro muestras (Figura 1), con calibres digitales y analógicos de diferentes marcas y precisiones: Los calibres digitales tenían una precisión de 0.01 mm, y los analógicos de 0.02 mm. Se calcularon para el ancho y el largo los valores medios y las desviaciones estándar correspondientes para cada tipo de grano. Cada muestra fue medida por dos usuarios para analizar variabilidad usando el calibre como instrumento de medida. Ninguno de los usuarios tenía entrenamiento previo en la forma de medir semillas, aunque sabían emplear el calibre para realizar determinaciones de longitud.

Figura 1: Medida de (a) longitud y (b) ancho de un grano de maíz con calibre digital

A fin de validar el modelo propuesto para la determinación de las dimensiones por PDI empleando la elipse que mejor ajusta, las imágenes de cada muestra se obtuvieron con dos dispositivos diferentes: empleando como soporte una caja de cartón (de 27 cm por 25 cm de base y 21 cm de altura) y una cámara estándar de un celular de gama media y, por otro lado, usando diferentes escáneres de escritorio a una resolución de 200 puntos por pulgada (Figura 2). Así, para cada muestra, se obtuvieron imágenes de la misma por diferentes dispositivos. De esta forma, se pretende simular en los posibles laboratorios donde se adquieran las imágenes.

Figura 2: (a) Celular y soporte (b) Escáner de escritorio

Cuando se empleó en celular como método de registro, se tuvo precaución de que se encuentre paralelo a la superficie donde se encontraban los granos para que la imagen no presente aberraciones. Se empleó una hoja cuadriculada

para visualizar que la imagen no presente deformaciones.

Como fondo se usó para todos los casos una superficie de color azul real, porque este color asegura, al separarlo en canales para su procesamiento, una adecuada separación del fondo y del objeto (granos). La Figura 3 presenta una imagen obtenida con una cámara digital y el soporte y una imagen obtenida con un escáner de escritorio. En la misma, se puede observar a la izquierda la ubicación de una regla y una moneda para luego establecer los factores de escala correspondientes. Estos objetos (regla o moneda) pueden ser "filtrados" del conteo de objetos a partir de su tamaño.

Las imágenes obtenidas luego se procesaron con ImageJ®. Las operaciones que se realizaron fueron las siguientes (Fig. 4):

- Separación en los canales RGB (rojo, verde y azul por sus siglas en inglés).
- Selección del canal y del umbral más apropiado para la binarización en base al histograma y así poder distinguir fondo de objeto. Una mala selección del canal sobre el que se hace la binarización, puede provocar que los contornos del grano se confundan con el fondo como se puede apreciar en la Figura 5,
- Establecimiento de la escala en el caso de la imagen obtenida por la cámara digital (a partir de las dimensiones del objeto de referencia) o de la resolución de escaneo.
- Selección de los objetos en base a diferentes descriptores (área, circularidad, etc)
- Generación de tabla con resultados con los valores de las longitudes de los ejes mayor y menor de la elipse que mejor ajusta.
- Visualización de la elipse que mejor ajusta superpuesta a la imagen del grano del grano a efectos de contrastar si los ejes de la elipse representan al largo y ancho de los granos bajo análisis.

Una de las ventajas que tiene ImageJ® es que esta secuencia de tareas se puede programar en una macro, es decir, que para una configuración dada (habiendo seleccionado el canal adecuado, el umbral para realizar la binarización, etc.), el proceso de medida se puede realizar en mínimo tiempo.

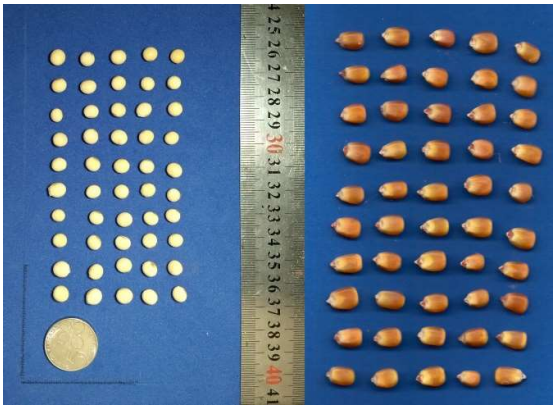


Figura 3: Izquierda, imagen obtenida con cámara digital y soporte. Derecha, imagen obtenida con escáner

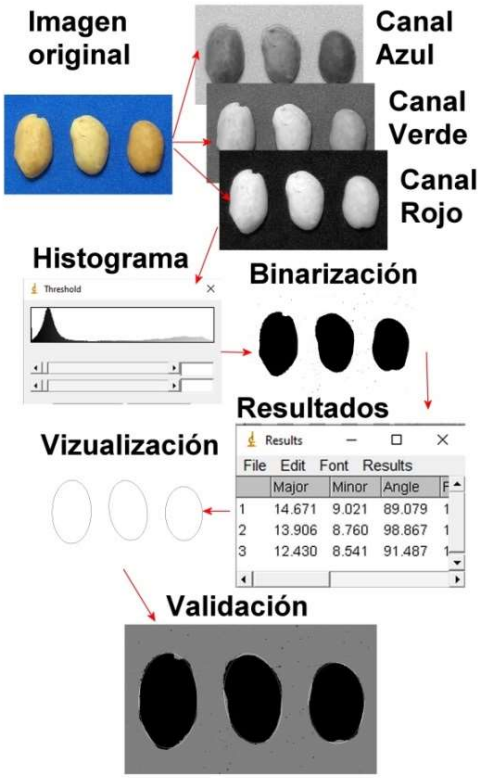


Figura 4: Secuencia de operaciones en ImageJ®

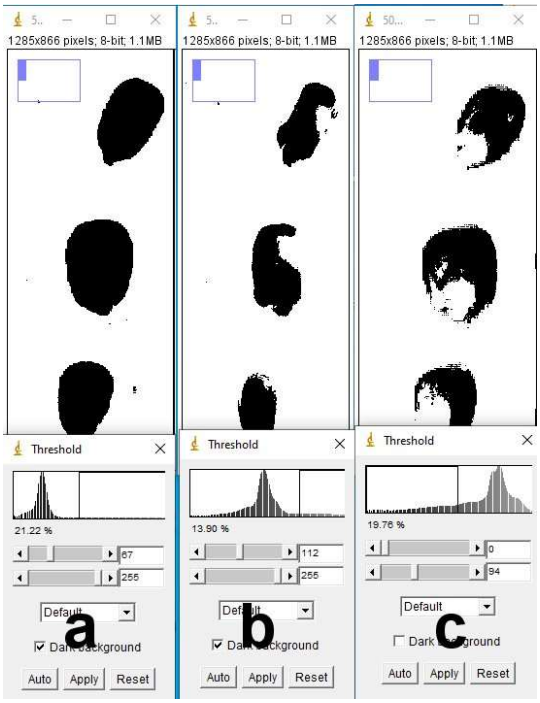


Figura 5: Selección del canal adecuado para la binarización.

3. Resultados y Discusión

Se presentan a continuación los resultados obtenidos para cada tipo de grano. En la Tabla 1, se puede visualizar los valores del largo y ancho promediado y la desviación estándar obtenidos por diferentes dispositivos para el grano de soja y similar información en las Tablas 2, Tabla 3 y Tabla 4 para los granos de maní, maíz y girasol respectivamente.

Tabla 4: Longitud de ejes mayor y menor de granos de soja

	Calibre Analógico	Calibre Digital	Cámara Digital	Escáner
Largo (mm)	6,45 ± 0,40	6,35 ± 0,38	6,61 ± 0,45	6,48 ± 0,40
Ancho (mm)	5,97 ± 0,40	6,03 ± 0,30	6,02 ± 0,36	5,97 ± 0,30

Tabla 5: Longitud de ejes mayor y menor de granos de maní

	Calibre Analógico	Calibre Analógico	Cámara digital	Escáner
Largo (mm)	14,42 ± 1,37	14,30 ± 1,37	14,72 ±1,38	13,99 ± 1,39
Ancho (mm)	8,89 ± 0,66	9,05 ± 0,98	9,36 ± 0,69	8,95 ± 0,70

Tabla 6: Longitud de ejes mayor y menor de granos de maíz

	Calibre Analógico	Calibre Analógico	Cámara digital	Escáner
Largo (mm)	11,42 ± 1,03	11,38 ± 1,22	10,68 ± 1,12	11,42 ± 1,08
Ancho (mm)	7,70 ± 0,63	7,65 ± 0,93	7,43 ± 0,59	7,77 ± 0,61

Tabla 7: Longitud de ejes mayor y menor de granos de girasol

	Calibre Analógico	Calibre Digital	Cámara Digital	Escáner
Largo (mm)	8,57 ± 0,64	8,66 ± 0,59	8,59 ± 0,55	8,45 ± 0,53
Ancho (mm)	4,50 ± 0,46	4,55 ± 0,45	4,78 ± 0,47	4,72 ± 0,47

A fin de poder contrastar los valores obtenidos de las longitudes de los ejes por PDI en relación a los obtenidos con el empleo de calibre, se calculan, para cada medición con calibre (digital o analógico) la desviación relativa porcentual (DRP) correspondiente a la realizada con el otro calibre (digital o analógico) y a las dos obtenidas por PDI a partir de la imagen obtenida con la cámara digital y con el escáner. Estos resultados se presentan en las Tablas 5, 6, 7 y 8 para los granos de soja, maní, maíz y girasol respectivamente.

Tabla 8: DRP para granos de soja expresado en porcentaje (%)

	Largo	Ancho
Medida de Referencia →	*Calibre Analógico*	*Calibre Analógico*
Calibre Digital	1,6	1,0
Cámara Digital	2,5	0,8
Escáner	0,5	0,0
Medida de Referencia →	*Calibre Digital*	*Calibre Digital*
Calibre Analógico	1,6	1,0
Cámara Digital	4,1	0,2
Escáner	2,0	1,0

Tabla 9: DRP para granos de maní expresado en porcentaje (%)

	Largo	Ancho
Medida de Referencia →	Calibre Analógico 1	Calibre Analógico 1
Calibre Analógico 2	0,8	1,8
Cámara Digital	2,1	5,3
Escáner	3,0	0,7
Medida de Referencia →	Calibre Analógico 2	Calibre Analógico 2
Calibre Analógico 1	0,8	1,8
Cámara Digital	2,9	3,4
Escáner	2,2	1,1

Tabla 10: DRP para granos de maíz expresado en porcentaje (%)

	Largo	Ancho
Medida de Referencia →	Calibre Analógico 1	Calibre Analógico 1
Calibre Analógico 2	0,4	0,6
Cámara Digital	6,5	3,5
Escáner	0,0	0,9
Medida de Referencia →	Calibre Analógico 2	Calibre Analógico 2
Calibre Analógico 1	0,4	0,7
Cámara Digital	6,2	2,9
Escáner	0,4	1,6

Tabla 11: DRP para granos de girasol expresado en porcentaje (%)

	Largo	Ancho
Medida de Referencia →	*Calibre Analógico*	*Calibre Analógico*
Calibre Digital	1,1	1,1
Cámara Digital	0,2	6,3
Escáner	1,4	4,9
Medida de Referencia →	*Calibre Digital*	*Calibre Digital*
Calibre Analógico	1,0	1,1
Cámara Digital	0,8	5,1
Escáner	2,4	3,7

El análisis de los valores obtenidos y las DRP nos permite concluir lo siguiente:

- En los casos donde se emplea el escáner como instrumento de registro, la DRP es del orden del 1.5% para el caso del eje mayor y del 1.9% para el eje menor.
- Cuando se emplea una cámara digital, las DRP tienden a duplicarse: 3.2% para el eje mayor y 3.4% para el eje menor.
- Las DRP medidas por diferentes usuarios con calibres diferentes es del 0.9% para el caso de la longitud de la semilla, y del orden del 1.1% para el ancho de la semilla.
- Los mayores errores se comenten en aquellas semillas que cuenten con protuberancias en sus extremos. En la Figura 6 se puede observar que en el caso de la semilla de girasol, la presencia de esta pequeña protuberancia en el extremo del grano, provoca un error con relación a la longitud del eje de la elipse que mejor ajusta, mientras que esto no se ve en el caso de un grano de maní.

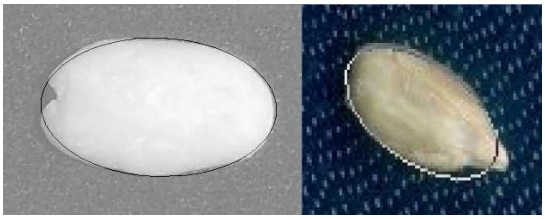


Figura 6: Granos de maní y girasol y elipse que mejor ajusta

4. Conclusiones

A partir de los resultados expuestos en el presente trabajo relacionado con la determinación del largo y ancho en granos de soja, maní, maíz y girasol a partir del cálculo de los ejes de la elipse que mejor ajusta, obtenidas por PDI, demuestra ser un método alternativo para la determinación de estas magnitudes. Este método se caracteriza por ser de bajo costo, fácil implementación, de buena precisión, rápido y no requiere ningún tipo de entrenamiento previo por parte del usuario. Así mismo no requiere de equipamiento caro, ya que queda demostrado que las imágenes pueden ser obtenidas con un celular o con un escáner.

Las operaciones de PDI se pueden incluir en una macro con todos los parámetros de ajustes necesarios.

El mayor problema que se puede encontrar, es el de definir los umbrales adecuados para realizar la binarización. Estas cuestiones podrían ser resueltas de manera inmediata con un escáner con adaptador de transparencias.

Las restricciones de su empleo en relación al tipo de grano, son reducidas y compensadas por la velocidad del método de registro.

Como desventaja, se puede mencionar la limitación en la cantidad de granos que se pueden procesar que son los que pueden caber en la bandeja de un escáner.

Los autores del presente artículo están desarrollando una cinta transportadora de granos de bajo costo que permita tomar imágenes de una mayor cantidad de los mismos equivalente a las que se mencionan en los protocolos de muestreo.

5. Referencias

Boldor D., Sanders T. H., Swartzel K. R., Simunovic J. (2002). Computer-Assisted Color Classification of Peanut Pods. Peanut Science. Vol. 29, Issue 1, pages 41 - 46.

Cleva, M.S.; Sampallo, G.M.; González Thomas, A. O.; Acosta, C.A. (2013). Método para la determinación del volumen de una muestra de granos de arroz mediante el procesamiento digital de imágenes. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 39(2), 185–190.

Hemender T., Sushma S., Mor V. S., Jitender Y., Axay B. (2018). Image Analysis A Modern Approach to Seed Quality Testing. Current Journal of Applied Science and Technology. 27, 1, 1-11.

Mirzabe A. H., Khazaei J., Chegini G. R. (2012). Physical properties and modeling for sunflower seeds. CIGR Journal. 14, 3, 190-202.

Momin A., Yamamoto K., Miyamoto M., Kondo N., Grift,T. (2017). Machine vision based soybean quality evaluation. Computers and Electronics in Engineering. Vol. 140, Aug. 2017, pages 452-460.

Namías R., Gallo C., Craviotto R., Arango M., Granitto P. (2012). Automatic Grading of Green Intensity in Soybean Seeds. Proceedings of 13th. Argentine Symposium on Artificial Intelligence, ASAI 2012. JAAIO.

Shahin M. A., Symons S. J. (2005). Seed sizing from images of non-singulated grain samples. Canadian Grain Commission. Grain research laboratory.

Van Dalen G. (2004). Determination of the size distribution and percentage of broken kernels of rice using flatbed scanning and image analysis. Food Research International, 37(1) 51-58.

Vasishth D., Bavarva A. (2015). Image Processing Method For Embedded Optical Peanut Sorting, I.J. Image, Graphics and Signal Processing, 12, 39-46.

Yuanyuan Z., Jilong Z., Lingshen F. (2016). Research on Quality Evaluation of Maize Seed Shape Based on Suport Vector Machine. 2016 2nd IEEE International Conference on Computer and Communications (ICCC). 695-699.

34TCA - Aprovechamiento del residuo industrial del membrillo para la extracción de pectinas empleando tecnología ecoamigable.

Use of industrial quince waste for the extraction of pectin, using eco-friendly technology.

Mathias Adrián Riveros Gomez[1,2], Celina Valeria Podetti[1], María Celia Román[1,2], Rosa Ana Rodríguez[1,2], María Paula Fabani[1,2,3].

1. Instituto de Ingeniería Química – Facultad de Ingeniería (UNSJ) – Grupo Vinculado al PROBIEN (CONICET UNCo).
2. CONICET.
3. Instituto de Biotecnología – Facultad de Ingeniería (UNSJ). Av. Libertador Gral. San Martín (Oeste) 1109 CPA: J5400ARL – San Juan – Argentina.
   E-mail: mathiasriveros14@gmail.com

Resumen

Las industrias procesadoras de membrillo generan cantidades considerables de residuos, los cuales son una fuente potencial de pectinas naturales. La técnica más empleada para llevar a cabo la extracción, consiste en la hidrólisis ácida del residuo utilizando ácido clorhídrico, nítrico o fosfórico, siendo estos costosos y contaminantes. El objetivo de este trabajo consiste en aplicar un método alternativo para la extracción de pectinas del residuo industrial de membrillo (ácido cítrico como agente hidrolizante y el empleo de ultrasonido), variando las condiciones de extracción: pH, temperatura, tiempo y relación muestra seca/solvente de extracción (m/v); para determinar bajo qué condiciones operativas se obtienen los mayores rendimientos para el proceso extractivo. Se pudo observar que los rendimientos de extracción aumentan con el incremento de la temperatura y tiempo, y la disminución del pH y relación m/v. El mayor rendimiento de extracción fue de 17,01 ± 0,29 % y se obtuvo para pH 2, 90°C, 60 min y relación m/v de 1/25.

Palabras clave: pectinas, valorización, residuos, membrillo.

Abstract

Quince processing industries generate considerable quantities of waste, which are a potential source of natural pectins. The most commonly used extraction technique consists of acid hydrolysis of the residue using hydrochloric, nitric or phosphoric acid, which are costly and polluting. The aim of this work is to apply an alternative method for the extraction of pectins from industrial quince residue (citric acid as a hydrolyzing agent and the use of ultrasound), varying the extraction conditions: pH, temperature, time and dry sample/extraction solvent ratio (m/v); to determine under which operating conditions the highest yields are obtained for the extraction process. It could be observed that the extraction yields increase with increasing temperature and time, and decreasing pH and m/v ratio. The highest extraction yield was 17.01 ± 0.29 % and was obtained for pH 2, 90°C, 60 min and m/v of 1/25.

Keywords: Pectins, valorization, waste, quince.

1. Introducción

El membrillo (*Cydonia oblonga* Miller) pertenece a la familia de las rosáceas a la cual también pertenecen peras y manzanas, es un fruto ampliamente cultivado debido a sus propiedades culinarias, terapéuticas y nutricionales. Este fruto está constituido principalmente de azúcares, ácidos orgánicos, polisacáridos y en menores proporciones proteínas, lípidos y vitaminas. También se destaca su elevada cantidad de polifenoles, como así también su actividad antioxidante.

En Argentina se producen aproximadamente 28.500 toneladas anuales de membrillo según lo reportado por la FAO (2021), ubicando al país en el séptimo lugar en producción. El Censo Nacional Agropecuario (2018) realizado por el INDEC, indica que Mendoza y San Juan son las dos provincias con mayor producción con 1500 y 450 hectáreas cultivadas, respectivamente.

El fruto fresco raramente se consume, debido a la dureza de su pulpa, acidez, amargor y astringencia, por lo tanto, es imprescindible su procesamiento previo al consumo. Aproximadamente el 15% del fruto está comprendido por la piel, corazón y semillas generando residuos en la industrialización del fruto cuando se elabora dulce de membrillo rubio (Alimentos Argentinos, 2017).

La extracción de pectinas es una de las opciones más prometedoras para los residuos generados en la cadena productiva y el procesamiento del membrillo (Kubule *et al.*, 2017). Las pectinas son complejos polisacáridos compuestos principalmente por ácido D-galacturónico con importantes propiedades gelificantes y de absorción, lo que las hace ampliamente empleadas en las industrias alimenticias, farmacéuticas y cosméticas (Forni *et al.* 1994; Chasquibol *et al.*, 2008; Espinoza *et al.*, 2015). En las frutas, la mayoría de los grupos ácidos se encuentran esterificados por metanol, el cuál puede perderse fácilmente por hidrólisis ácida o enzimática, siendo la primera una de las técnicas más simples y económicas empleadas para su extracción.

Numerosos autores utilizaron para la hidrólisis de sus muestras ácidos costosos y poco amigables con el medio ambiente como son el clorhídrico, nítrico y sulfúrico, pero obteniendo elevados rendimientos de extracción de pectinas: 7.7 % en calabaza (Yoo *et al.* 2012), 19.3 % en cáscaras de melón (Petkowics *et al.* 2017), 32.1 % en membrillo (Brown *et al.*, 2013). Otros autores sugieren el empleo de ácidos menos contaminantes como el acético, cítrico, tartárico, láctico, entre otros (Mierczynska *et al.*, 2016), para los cuales obtuvieron muy buenos rendimientos máximos: 21.0 % en *Terminalia ferdinandiana* (Chaliha *et al.*, 2017), 14.3 % en cáscaras de melón (Raji *et al.* 2017), 5.8 % en cáscaras de melón (Sari *et al.*, 2017), 6.1 – 13.3 % en pieles de diferentes frutas (Güzel y Akpinar, 2019), 8.4 % en cáscara de sandía (Lee *et al.*, 2020). Se ha comprobado que el proceso de extracción asistido con ultrasonido ayuda a mejorar los rendimientos del proceso, esto se probó en residuos de frutos como tomates (Grassino *et al.*, 2016), maracuyá (Freitas *et al.*, 2016), cáscaras de mango (Wang *et al.*, 2016), cáscaras de naranjas (Prakash *et. al.* 2016), residuo industrial de bananas (Hosseini *et al.* 2019) y alcachofas (Sabater *et al.* 2020), entre otros.

El objetivo de este trabajo fue aprovechar el residuo obtenido de la elaboración de dulce de membrillo rubio, para la extracción de pectinas asistido por ultrasonido, empleando ácido cítrico como agente hidrolizante y variando las condiciones de extracción: temperatura, pH, tiempo y relación muestra seca/ solución de ácido cítrico (m/v). Para luego analizar bajo qué condiciones operativas se obtiene el mayor rendimiento de extracción de pectina de este residuo. Es importante destacar, que no se encontraron reportes donde se utilice ácido cítrico y sonicado para la extracción de pectinas en la matriz en estudio.

2. Materiales y métodos

Obtención y procesamiento de las muestras.

En el mes de abril de 2019, la empresa "Dulce Pizarro S.R.L." de la provincia de San Juan, Argentina proveyó las muestras de residuo de membrillo para llevar a cabo la investigación. Las muestras consistieron en pieles, corazones y semillas de membrillo, los cuales representan descartes del proceso de elaboración de dulce de membrillo rubio. Las muestras recolectadas se almacenaron a 4 °C hasta su posterior secado a 50 °C en horno convectivo durante 24 hs (humedad < 15%). El residuo seco, se trituró empleado un molinillo (marca TecnoDalvo, modelo TDMC) y se almacenó en bolsas selladas en ambiente seco y oscuro hasta realizar las extracciones de pectina correspondientes.

Caracterización de las muestras.

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización química del residuo seco, para ello, se determinó: humedad (Método AOAC 925.10), lípidos (Método AOAC 920.39: extracción por Soxhlet), proteínas (Método AOAC 960.52: Método de

Kjeldahl), cenizas (Método AOAC 923.03: por calcinación a 580°C hasta obtención de cenizas blancas), fibra cruda (Método AOAC 962.09), y además el contenido de lignina Klason (Método Estándar ASTM D1106-56), celulosa (Método Estándar ASTM D1103-60), holocelulosa (método propuesto por Browning, B.L., 1967) y hemicelulosa (por diferencia entre holocelulosa y celulosa). Por otra parte, en el residuo fresco se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH (Método AOAC 10.042), acidez titulable (Método AOAC 942.15) y contenido de sólidos solubles (Método AOAC 932.12). Adicionalmente, se determinó el contenido de polifenoles realizando extractos Metanol:Agua 80:20 HCl 0,1%, para medir la concentración total de compuestos fenólicos (FT) por el método de Folin-Ciocalteau y la actividad antioxidante In vitro: actividad atrapadora del radical DPPH (Tapia et al., 2004), TEAC (Baroni et al., 2012) y FRAP (Baroni et al., 2012). Cada una de las determinaciones se realizaron en triplicado (n=3).

Extracción de pectinas.

Las extracciones se realizaron aplicando las técnicas propuestas por Grassino *et al.* (2016) y Ganesh *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.5 ± 0.01 g de muestra y se colocaron en tubos Falcon de 15 mL de capacidad a las cuáles se les agregó la solución de ácido cítrico previamente preparada. Inmediatamente después, las muestras fueron inmersas en baño ultrasónico con calefacción (Marca Arcano, modelo PS-10A, de 2 L de capacidad) a la temperatura y tiempo correspondientes para cada ensayo; el baño fue previamente calentado y la temperatura controlada durante el proceso extractivo. Las variables consideradas para comparar los procesos de extracción fueron: pH (2, 2,5 y 3), tiempo (30, 45 y 60 min), temperatura (70, 80 y 90 °C) y la relación muestra seca / solución de ácido cítrico (1/20 y 1/25).

Finalizados los procesos de extracción, se centrifugó las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos para facilitar el posterior proceso de filtrado. Se filtró el extracto líquido para eliminar sólidos remanentes y se recolectó el filtrado en tubos Falcon de 15 mL a los cuáles se les agregó 5 mL de etanol (alcohol etílico al 96%) para precipitar las pectinas. El residuo sólido se colocó en cajas de Petri y secó a 50 °C para su posterior caracterización y evaluar de ese modo posibles usos del mismo, consiguiendo así el aprovechamiento integral del residuo. Los extractos precipitados se almacenaron en refrigeración durante 24 hs para mejorar la gelificación de la pectina. Luego del tiempo de enfriamiento se filtró la pectina utilizando papeles de filtro previamente pesados y la pectina se lavó dos veces con alcohol etílico al 70 % para eliminar impurezas (monosacáridos, disacáridos y compuestos fenólicos). Se secó la pectina junto al papel de filtro a 50 °C hasta peso constante y para el cálculo del porcentaje de pectina (η) se utilizó la ecuación (1).

$$\eta\ (\%) = [\text{Pectina seca (g)}/\text{Muestra seca (g)}] \times 100 \quad (1)$$

Las extracciones se realizaron por quintuplicado para cada una de las condiciones evaluadas.

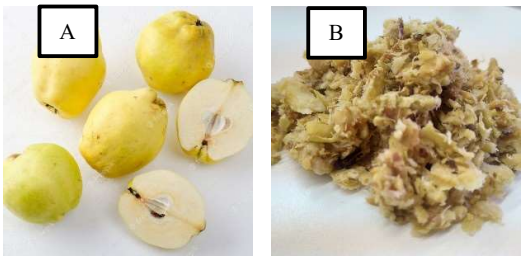
Análisis estadístico de los resultados.

Para comparar si existen diferencias significativas entre las variables estudiadas, se realizó el análisis estadístico de varianza correspondiente (ANOVA) empleando la prueba de Fisher (α=0,05) usando el software InfoStat

3. Resultados y Discusión

Procesamiento de las muestras.

La empresa procesa el membrillo fresco (Figura 1 A) para la elaboración de dulce de membrillo rubio. Las pieles, corazones y semillas constituyen el residuo generado (Figura 1 B), el cual fue provisto por la empresa y luego secado y triturado, obteniéndose así la muestra de residuo de membrillo a la cual se le hará el proceso de extracción de pectinas (Figura 1 C). En la Figura 1 D se pueden apreciar la pectina antes de su secado a 50 °C en las condiciones de extracción en la cual se alcanzó los máximos rendimientos. La Figura 1 E muestra la pectina posterior a su secado y la 1 F, muestra el sólido remanente de la extracción de pectinas, cuyo análisis será objeto de un trabajo posterior.



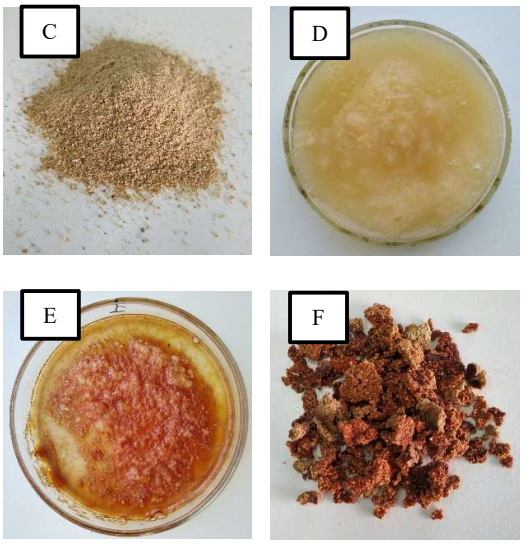


Figura 1. A) Membrillo fresco antes de su procesamiento industrial. B) Residuo de membrillo fresco. C) Residuo seco y triturado. D) Pectina fresca. E) Pectina seca. F) Sólido remanente seco después de realizada la extracción.

Caracterización del residuo.

Las propiedades fisicoquímicas medidas en el residuo fresco (previo al proceso de secado) se muestran en la Tabla 1.

Respecto a los parámetros medidos, cabe destacar la importancia del pH y la acidez, ya que las mismas favorecen el proceso hidrolítico para llevar a cabo la extracción de las pectinas. Los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos en pulpa de membrillo por Raji *et al.* (2017). Los grados Brix (° Brix) son inferiores a los reportados por Sharma *et al.* (2011) para pulpa de membrillo, esto se explica debido a que la mayoría de los azúcares integran la pulpa y el residuo utilizado en esta investigación es integrado principalmente por semillas, pieles y corazones de membrillo, conteniendo pequeñas cantidades de pulpa.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del residuo de membrillo fresco.

Parámetro	Contenido
Humedad [%]	72,0 ± 2,0
pH	3,82 ± 0,03
Acidez titulable [g ácido málico/L]	0,57 ± 0,02
Sólidos Solubles [° Brix]	7,2 ± 0,1

En la Tabla 2 puede apreciarse la composición proximal del residuo en base seca (bs). Los valores de lípidos y proteínas determinados son bajos para este residuo (Tabla 2). Los constituyentes mayoritarios del residuo corresponden a material lignocelulósico (26,05 %) y fibra cruda (7,02 %), tales porcentajes se encuentran dentro de los rangos reportados por otros autores en pulpa de membrillo (Rop *et al.* 2011; Hanan *et al.*, 2020) y en residuo formado por pieles, semillas y corazones de membrillo (De Escalada Pla, *et al.* 2010). Mientras que el contenido de cenizas es bajo y según Hanan *et al.* (2020) está relacionado con el aporte de minerales (K, Ca, Na y Mn).

Tabla 2. Composición proximal del residuo de membrillo en base seca (bs).

Componentes	Contenido [%]
Lípidos	0,48 ± 0,03
Proteínas	0,28 ± 0,02
Cenizas	0,46 ± 0,02
Fibra Cruda	7,02 ± 1,06
Lignina	6,68 ± 0,22
Holocelulosa	19,37 ± 0,14
Celulosa	16,15 ± 1,58
Hemicelulosa	3,22 ± 1,01

Se determinó el contenido de Fenólicos Totales (FT) y actividad antioxidante del residuo fresco (Figura 1 B) y seco (Figura 1 C), con el objeto de evaluar la influencia del proceso de secado en la actividad antioxidante de los residuos (Tabla 3). Los FT en el residuo seco presentaron valores superiores que los frescos (relación muestra seca/muestra fresca = 2). La actividad antioxidante fue también mayor en los residuos secos, en una relación entre 1,8-2,7 para los ensayos realizados. Al extrapolar los resultados de peso seco a peso fresco (considerando el contenido de humedad de los mismos), se observó una disminución en el contenido de FT y capacidad antioxidante del residuo seco respecto al húmedo, representando una pérdida de aproximadamente 50 %. Es importante destacar que el residuo aporta compuestos antioxidantes y bioactivos tal como los reportados por otros autores (Griñán *et al.*, 2019; Sabir *et al.*, 2015; Hanan *et al.*, 2020), que contribuyen al valor nutricional del mismo.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del residuo de membrillo fresco.

Determinación	Muestra Fresca [a]	Muestra Seca [b]
Fenólicos Totales [mg AG/100 g muestra]	363 ± 60	741 ± 53
DPPH [mg Trolox/g muestra]	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1
FRAP	1,3 ± 0,3	2,7 ± 0,2

[mg Trolox/g muestra]		
TEAC [mg Trolox/g muestra]	1,5 ± 0,1	4,0 ± 0,1

[a] Resultados en base húmeda (bh).
[b] Resultados en base seca (bs).

Rendimientos de extracción del proceso.

Para comparar los rendimientos de extracción de pectinas se tomaron como variables el pH de la solución de ácido cítrico, tiempo de extracción, temperatura y relación muestra seca/solución de ácido cítrico. En la Figura 2, 3 y 4, es posible apreciar los rendimientos de extracción para las temperaturas de 70, 80 y 90 °C respectivamente.

En las gráficas expuestas se puede apreciar que el máximo rendimiento alcanzado fue de 17,01±0,29 % para las condiciones de extracción: pH 2, 90 °C, 60 minutos y m/v 1/25. Para pH 2,5 y 3 se consiguieron los mayores rendimientos cuando las variables tomaron los valores de 90 °C, 60 minutos y m/v 1/25 siendo de 11,39±0,22 % y 9,71±0,18 % respectivamente. Si bien las extracciones a pH 2 fueron los más altos, es de gran importancia destacar, que para la preparación de solución de ácido cítrico pH 2,5 y 3 se consumen aproximadamente 8,69 y 61,58 veces menos de ácido cítrico respectivamente, por lo cual sería pertinente analizar las extracciones desde un punto de vista económico, buscando optimizar el proceso con el objeto de minimizar los costos.

En términos generales, en coincidencia con Alfa y Abilasha (2016), Bayar *et al.* (2017) y Kavak *et al.* (2017), los rendimientos de extracción fueron superiores al aumentar el tiempo y la temperatura, y disminuir el pH y la relación muestra seca/solución de ácido cítrico. Al realizar el análisis estadístico de varianza (ANOVA) aplicando la prueba de Fisher utilizando un α=0,05, entre las diferentes condiciones de extracción para los porcentajes de pectina obtenidos, se observaron diferencias significativas para todas las condiciones en estudio (tiempo, pH, temperatura y relación m/v).

La extracción de pectinas en residuo de membrillo también fue estudiada por Brown *et al.* (2013) obteniendo rendimientos similares, pero empleando ácido nítrico como solución hidrolítica, este es más costoso y menos amigable con el medio ambiente que el ácido cítrico. Los autores Acickgoz *et al.* (2011), Sharma *et al.* (2011) y Rop *et al.* (2011) obtuvieron como máximo rendimiento de extracción en residuos de membrillo similares al estudiado 1,83, 1,80 y 3,50 % utilizando ácido cítrico y agitación, estos son considerablemente más bajos que los obtenidos en esta investigación lo que permite afirmar que asistir las extracciones mediante ultrasonido favorece considerablemente el proceso extractivo. Por otra parte, autores como Raji *et al.* (2013) y Güzel *et al.* (2019) alcanzaron rendimientos similares a los de este trabajo utilizando procedimientos de extracción similares en residuos de melón (14,3 %) y manzanas (13,3 %) respectivamente.

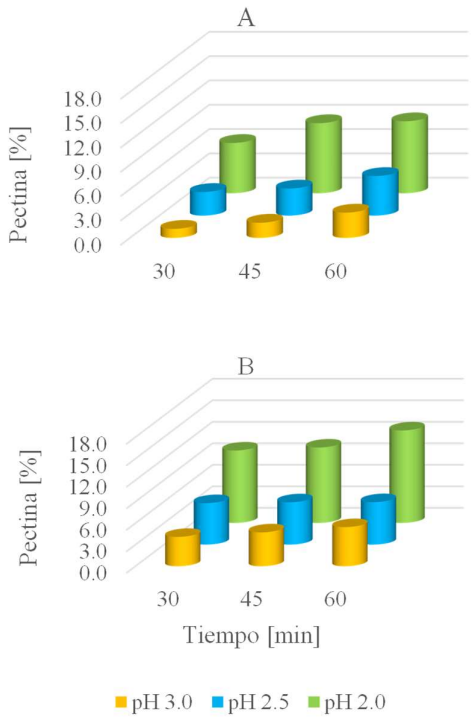
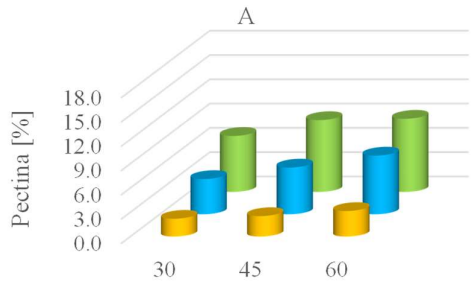


Figura 2. Rendimiento de extracción de pectinas a 70°C, variando pH, tiempo y relación muestra seca/ácido cítrico. A) m/v = 1/20. B) m/v = 1/25.



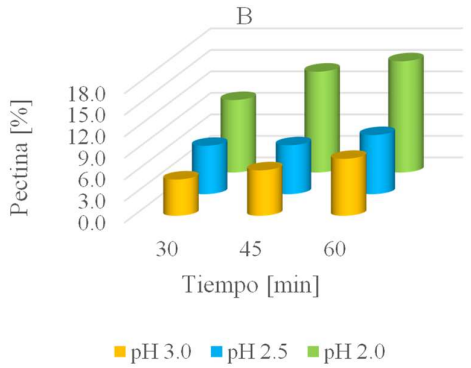


Figura 3. Rendimiento de extracción de pectinas a 80°C, variando pH, tiempo y relación muestra seca/ácido cítrico. A) m/v = 1/20. B) m/v = 1/25.

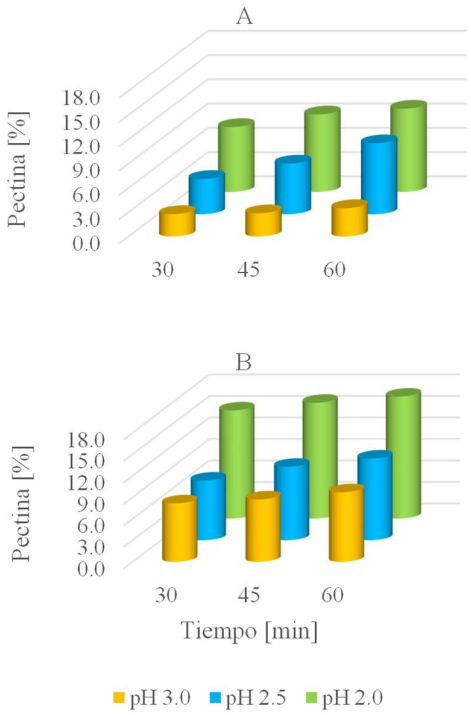


Figura 4. Rendimiento de extracción de pectinas a 90°C, variando pH, tiempo y relación muestra seca/ácido cítrico. A) m/v = 1/20. B) m/v = 1/25.

4. Conclusiones

Se comparó el proceso de extracción de pectinas de residuo industrial de membrillo utilizando un método amigable con el medio ambiente (uso de ácido cítrico y reduciendo los tiempos de extracción por ultrasonido) tomando como variables el pH, tiempo, temperatura y relación muestra seca/solución de ácido cítrico consiguiendo muy buenos rendimientos en los procesos extractivos. Si bien, el máximo rendimiento alcanzado fue de 17,01±0,29 % para pH 2, 60 min, 90°C y m/v 1/25, los rendimientos obtenidos para pH 2,5 y 3 fueron aceptables, lo cual serían alternativas a considerar ya que la cantidad de ácido cítrico utilizado se reduce considerablemente. A futuro se plantea realizar un proceso de optimización multiobjetivo del proceso buscando la minimización de los costos y maximización del rendimiento del proceso, teniendo en cuenta la cantidad de ácido cítrico consumida (pH y relación m/v) y la reducción del consumo energético (temperatura y tiempo de extracción).

Por otro lado, el residuo estudiado es rico en fibras, compuestos lignocelulósicos y antioxidantes, lo que permitiría utilizarlo también como alternativa de ingrediente en formulaciones de alimentos para animales de granja. Además, el sólido remanente (posterior a la extracción de pectinas) se está caracterizando para evaluar su potencial uso para la elaboración de alimentos balanceados para animales y/o biochar, consiguiendo así el aprovechamiento integral del residuo industrial de la elaboración de dulce de membrillo rubio.

5. Agradecimientos.

Los autores de este trabajo agradecen al establecimiento “Dulces Pizarro S.R.L.” que proveyó las muestras de residuo de membrillo empleadas en la investigación.

Se agradece también a las siguientes instituciones: CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas); Universidad Nacional de San Juan (PDTS Res. N° 589/20-CS; FONCYT-PICT 2017-1390 y FONCYT-PICT 2019-01810); Mathias Riveros y Celia Román posee beca doctoral de CONICET. Celina Podetti posee beca CICITCA-UNSJ. María Paula Fabani y Rosa Rodríguez son Miembros Investigadores de CONICET.

6. Referencias

Acikgoz C. (2011). *Extraction and Characterization of Pectin Obtained from Quince Fruits (Cydoinia vulgaris pers) Grown in Turkey*. Asian Journal of Chemistry, Volume 23 (1), 149-152.

Alfa P.; Abilasha D. (2016). *Extraction and characterization of pectin from lemon peel*. International Journal of Advanced Science and Research (1) 12-15.

Alimentos argentinos, 2017. *Nueva Denominación de Origen: "Dulce de Membrillo Rubio de San Juan"*. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Noticias/nota/1169 [acceso 7 de julio de 2021]

ANSI/ASTM., (1977a). *Standard test methods for lignin in wood* D 1106-56. American National Standard Institute, Washington DC.

ANSI/ASTM., (1977b). *Standard test methods for alpha-cellulose in wood* D 1103-60. American National Standard Institute, Washington DC.

AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis, Fifteenth Edition*. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.

Baroni, M.V. y otros 4 autores (2012). *How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines*. LWT – Food science and Technology, 47, 1-7.

Bayar N. y otros 5 autores (2017). *Ultrasonic extraction of pectin from Opuntia ficus indica cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties*. Food Chemistry (235) 275–282.

Brown V.; Lozano J.; Genovese D. (2013). *Pectin extraction from quince (Cydonia oblonga) pomace applying alternative methods; Effect of process variables and preliminary optimization*. Food Science and Technology International, Volume 20 (2), 83-98.

Browning, B.L. (1967). *Methods of wood chemistry*. Interscience Publishers, New York, USA.

Chaliha M. y otros 3 autores (2017). *Extraction and characterization of a novel Terminalia pectin*. Food Sci Biotechnol. DOI 10.1007/s10068-017-0201-4.

Chasquibol N.; Arroyo E.; Morales J. C. (2008). *Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana*. Universidad de Lima, Ingeniería Industrial 26, 175-199.

De Escalada Pla M. y otros 4 autores. (2010). *Influence of the isolation procedure on the characteristics of fiber-rich products obtained from quince wastes*. Journal of Food Engineering, Volume 96, 239–248.

Espinoza M y otros 7 autores (2015). *Aprovechamiento de los residuos del membrillo (Cydonia oblonga L.) como fuente de compuestos bioactivos*. Universidad Nacional de Trujillo, Agroind Sci 5.

FAO, 2021. Disponible en: http://www.fao.org/faostat

Forni E.; Penci M.; Polesello A. (1994). *A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (Cydonia oblonga Mill.) and prickly pear (Opuntia ficus indica) peel*. Carbohydrate Polymer 23, 231-234.

Freitas C. y otros 5 autores (2016). *Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound*. LWT Food Science and Technology, Volume 71, 110-115.

Ganesh I. y otros 5 autores (2017). *Ultrasound assisted extraction of pectin from waste Artocarpus heterophyllus fruit peel*. Ultrasonics Sonochemistry, Volume 34, 525–530.

Grassino A. y otros 5 autores (2016). *Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste*. Food Chemistry, Volume 198, 93-100.

Griñán I. y otros 5 autores (2019). *Volatile composition and sensory and quality attributes of quince (Cydonia oblonga Mill.) fruits as affected by wáter stress*. Science Horticulturae, Volume 244, 68-74.

Güzel M.; Akpinar Ö. (2019). *Valorization of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels*. Food and Bioproducts Processing, Volume 115, 126-133.

Hanan E.; Sharma V; Ahmad F. (2020). *Nutritional Composition, Phytochemistry and Medicinal Use of Quince (Cydonia oblonga Miller) with Emphasis on its Processed and Fortified Food Products*. Journal of Food Processing and Technology, Volume 11, 831.

Hosseini S.; Khodaiyan F.; Kazemi M.; Najari Z. (2019). *Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method*. International Journal of Biological Macromolecules, Volume 125, 621–629.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) (2018). *Censo Nacional Agropecuario 2018*. Resultados preliminares. Agricultura. Enero de 2020. ISBN 978-950-896-571-4

Kavak D. (2017). *Optimization of extraction time, temperature and solvent concentration for the antioxidant activity and total phenolic content of the Cydonia oblonga Mill. Leaves*. American-Eurasian journal of sustainable agriculture. Volume 11 (6) 1-6.

Kubule A.; Komisarova T.; Blumberga D. (2017). Optimization methodology for complete use of bio-resources. Energy Procedia 113, 28-34.

Lee K.; Choo W. (2020). *Extraction Optimization and Physicochemical Properties of Pectin from Watermelon (Citrullus lanatus) Rind: Comparison of Hydrochloric and Citric acid Extraction*. Journal of Nutraceuticals Food Science, Volume 5 (1), 1.

Mierczynska J., Cybulska J., Zdunek A. (2016). *Rheological and chemical properties of pectin enriched fractions from different sources extracted with citric acid*. Carbohydrate Polymers. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.042.

Petkowicz, C., Vriesmann L., Williams P. (2016). *Pectins from food waste Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin*. Food Hydrocolloids doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.10.040.

Prakash J. y otros 5 autores (2016). *Ultrasound Assisted Citric Acid Pectin Extraction from Industrial Waste of Musa Balbisiana*. Ultrasonics Sonochemistry, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.019A

Raji Z. y otros 4 autores (2017). *Extraction, optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel*. International Journal of Biological Macromolecules, Volume 98, 709-716.

Rop O. y otros 8 autores (2011). *Chemical Characteristics of Fruit of Some Selected Quince (Cydonia Oblonga Mill.) Cultivars*. Czech J. Food Sci. Volume 29 (1), 65-73.

Sabater C.; y otros 4 autores (2020). *Ultrasound-assisted extraction of pectin from artichoke by-products. An artificial neural network approach to pectin characterisation*. Food Hydrocolloids, Volume 98, 105238.

Sabir S. y otros 6 autores. (2015). *Pharmacognostic and clinical aspects of Cydonia oblonga: A review*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, Volume 5 (11), 850-855.

Sari A.; Ishartani D.; Dewanty P. (2017). *Effects of microwave power and irradiation time on pectin extraction from watermelon rinds (Citrullus lanatus) with acetic acid using microwave assisted extraction method*. International Symposium of Food and Agro-biodiversity (ISFA) 2017. IOP Conf. Series Earth and Enviromental Science 102 (2018) 012085.

Sharma R.; Joshi V.; Rana J. (2011). *Nutritional composition and processed products of Quince (Cydonia oblonga Mill.)*. Indian Journal of Natural Products and Resources, Volume 2 (3), 354-357.

Tapia A. y otros 5 autores (2004) *Free radical scavengers and antioxidants from Baccharis grisebachii*. Ethnopharmacol, 95, 155-161.

Wang M. y otros 7 autores (2016). *Characterization and functional properties of mango peel pectinextracted by ultrasound assisted citric acid*. International Journal of Biological Macromolecules, Volume 91, 794-803.

Yoo S. (2012). *Structural Characteristics of Pumpkin Pectin Extracted by Microwave Heating*. Journal of Food Science. Volume 77 (11), 169 – 173.

35TCA - Contenido de sorbato de potasio residual en ciruelas tiernizadas según el método de deshidratación.

Residual potassium sorbate content in tenderized plums according to the dehydration method.

Jesica Worlock[1], Delia Paola Urfalino[1], Martín Juan Daniele[1], Daniel Millán[2], Nicolás Muzi[2].

1. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA EEA Rama Caída. Dirección: El Vivero S/N Rama Caída.
2. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria UNCuyo. Dirección: Bernardo de Irigoyen 375 San Rafael.
   Correo electrónico de contacto: worlock.jesica@inta.gob.ar

Resumen

Las ciruelas d'Agen se deshidratan al sol o en horno y posteriormente se tiernizan, para lograr un producto listo para consumir. Al tiernizar, se les incorpora humedad, por lo cual es necesario utilizar sorbato de potasio para evitar el deterioro por hongos y levaduras. La absorción de este conservante es heterogénea. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el contenido de sorbato de potasio residual en ciruelas deshidratadas al sol y en horno. Se cosecharon ciruelas y se deshidrataron al sol y en horno, se controló humedad y actividad acuosa (aw) al finalizar la etapa. Posteriormente, se tiernizaron, se escurrieron y se descarozaron. Para cada método de secado se aplicaron 9 tratamientos (variando concentración y tiempo de aplicación de una solución de sorbato de potasio) con 3 repeticiones de 20 ciruelas tiernizadas cada uno. Se evaluó humedad, aw y contenido de sorbato de potasio residual de cada tratamiento. Las ciruelas deshidratadas al sol y en horno no presentaron diferencias estadísticamente significativas en humedad y aw ($p>0,05$). Mientras que, luego del tiernizado, existieron diferencias significativas entre las humedades y aw para ambos métodos de secado ($p<0,05$). Las ciruelas secadas al sol presentaron una mayor capacidad de rehidratación que las deshidratadas en horno. Por otro lado, el contenido de sorbato de potasio residual presentó diferencias significativas ($p<0,05$); en las ciruelas secadas al sol se distribuyó en forma heterogénea y fue mayor (1.520 ppm) que en las ciruelas deshidratadas en horno (867 ppm). Cabe mencionar que el 78% de los tratamientos aplicados a las ciruelas secadas al sol excedieron las 1.000 ppm de ácido sórbico permitido por el Código Alimentario Argentino. Este comportamiento podría atribuirse a daños en la piel de las ciruelas ocasionados por largos períodos de secado y oscilaciones térmicas.

Palabras clave: ciruelas d'Agen; Prunus domestica; (2E,4E)-hexa-2,4-dienoato de potasio; E202.

Abstract

D'Agen plums are sun-dried or oven-dried and later tenderized, to obtain a ready to eat product. During tenderizing, moisture is incorporated and for this reason it is necessary to use potassium sorbate to avoid spoilage by fungi and yeasts. The absorption of this preservative is heterogeneous. The aim of the present trial was to evaluate the content of residual potassium sorbate in sun-dried and oven-dried plums. Plums were harvested and sun-dried and oven-dried, humidity and water activity (aw) were controlled at the end of the stage. Subsequently, they were tenderized, drained and pitted. For each drying method, 9 treatments were applied (varying concentration and time of application of a potassium sorbate solution), with 3 repetitions of 20 tenderized plums each. Moisture, aw and residual potassium sorbate content of each treatment were evaluated. Sun-dried and oven-dried plums did not show statistically significant differences in humidity and aw ($p>0,05$). Although after tenderizing, there were significant differences between moisture and aw for both drying methods ($p<0,05$). Sun-dried plums had a higher rehydration capacity than oven-dried plums. In addition, residual potassium sorbate content showed significant differences ($p<0,05$); in sun-dried plums it was distributed heterogeneously and was higher (1.520 ppm) than in oven-dried plums (867 ppm). It is worth mentioning that 78% of the treatments applied to sun-dried plums exceeded the 1.000 ppm of sorbic acid allowed by the Argentine Food Code. This behavior could be attributed to damage to the skin of plums caused by long periods of drying and thermal oscillations.

Keywords: d'Agen plums; Prunus domestica; Potassium (2E,4E)-hexa-2,4-dienoate; E202.

1. Introducción

Las ciruelas (Prunus domestica) variedad d'Agen se destinan principalmente a la deshidratación debido a su elevado contenido de azúcares y excelente sabor (Somogyi, 2005). La misma se puede realizar al sol o en horno.

El secado al sol es un método tradicional en la provincia de Mendoza, generalmente utilizado por pequeños y medianos productores. Consiste en la extracción de la mayor parte del agua de la fruta a través de la exposición al sol. Habitualmente utilizan estructuras simples conocidas como "tendederos", construidas con postes de madera a 60-80 cm de altura y alambres tensados. Sobre éstos se colocan mallas plásticas, bandejas o esteras de caña y se extiende la fruta en una sola capa. Las ciruelas se suelen cubrir con nylon cristal colocado en forma plana, a dos aguas o en forma de semicírculo o túnel. Esta cobertura constituye una barrera microbiológica, contra insectos, animales y condiciones climáticas adversas y acelera el secado. La etapa dura entre 7 y 12 días, dependiendo de las condiciones climáticas. Las temperaturas de secado son moderadas y oscilantes, siendo las máximas alcanzadas (con cobertura de nylon) inferiores a 65ºC.

La deshidratación de ciruelas en horno es realizada habitualmente por empresas exportadoras. Se utilizan hornos de dos túneles dotados de un quemador (generalmente a gas) y un ventilador. Los túneles poseen rieles en su interior para la circulación de los carros, en los cuales se apilan bandejas con ciruelas. La cantidad de carros y de bandejas por carro varía según el diseño del horno. Lo usual es contar con 10 a 20 carros por túnel con 23 a 27 bandejas apiladas en cada uno. Los túneles de secado se clasifican por el sentido de ingreso de las ciruelas y el aire al túnel. En Argentina habitualmente se utilizan hornos a "contracorriente", en los cuales los carros con fruta fresca ingresan por el extremo del túnel con el aire a menor temperatura y cargado de humedad, y se extraen por el extremo con el aire a mayor temperatura y baja humedad. La etapa de deshidratación dura entre 16 y 24 horas dependiendo de la temperatura utilizada, el calibre y la madurez de la fruta. La temperatura máxima utilizada para el aire de secado varía entre 80 y 87ºC.

La utilización de hornos deshidratadores reduce el tiempo de secado, mejora el color de la pulpa y aumenta la retención de compuestos antioxidantes (Urfalino, et al., 2008).

Tanto en el secado al sol como en horno, éste finaliza cuando las ciruelas alcanzan una humedad entre 18 y 22%. El producto obtenido se almacena en un sitio cerrado en parvas o bins (500 kg), y debe removerse periódicamente para homogeneizar la humedad. Posteriormente, las ciruelas deshidratadas se someten a una limpieza y lavado y se realiza el tiernizado, con el objetivo de lograr un producto de textura suave, listo para consumir. En esta etapa se le incorpora humedad a la fruta, alcanzando un 30-34% de humedad final, por lo cual es necesario emplear un conservante para protegerla del deterioro por hongos y levaduras. Habitualmente se utiliza sorbato de potasio (E 202) debido a que inhibe o retarda el crecimiento de hongos, levaduras y ciertas bacterias (Chichester y Tanner, 1973; Sofos et al., 1986; Sofos, 2000; Stopforth, et al., 2005), posee excelente solubilidad en agua, inocuidad fisiológica y neutralidad organoléptica (Lück y Jager, 1997; Sofos, 2000; Stopforth, et al., 2005).

El conservante se aplica a las ciruelas tiernizadas (mediante inmersión o aspersión) con una concentración comprendida entre 2 y 7%, generalmente a temperatura ambiente.

El Código Alimentario Argentino establece que el contenido residual de sorbato de potasio en ciruelas tiernizadas (expresado como ácido sórbico) no debe exceder los 1.000 mg/kg o 1.000 ppm. Sin embargo, la absorción del conservante en las ciruelas es heterogénea. En la industria este problema suele atribuirse al método utilizado en el secado de las ciruelas, pero no hay antecedentes publicados que respalden esta observación. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el contenido de sorbato de potasio residual en ciruelas tiernizadas deshidratadas al sol y en horno.

2. Materiales y métodos

2.1. Materia prima

Las ciruelas (Prunus domestica) variedad d'Agen, de calibre chico (49 a 62 unidades frescas por kg), se cosecharon de los cultivos de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rama Caída (georreferencia: 34°40'03.93'' S 68°23'37.80'' O). Las mismas presentaron un contenido de sólidos solubles mayores a 20ºBrix (refractómetro digital Arcano DBR0045nD), y una firmeza de pulpa (penetrómetro Turoni FT 327) entre 0,2 y 0,3 kgf/cm^2, equivalente a 3 - 4 libras de presión por pulgada cuadrada.

2.2. Deshidratación

La deshidratación de las ciruelas se efectuó utilizando dos métodos;

Al sol, en un tendedero, con una base de malla plástica y sin cobertura de nylon cristal, alcanzando una temperatura máxima del aire de secado de 40ºC.

En el horno de la planta piloto de la EEA Rama Caída, utilizando la configuración a contracorriente, con una temperatura máxima del aire de secado de 82ºC y una velocidad de 2,5 m/s.
Para ambos métodos, se tomó una muestra de 1 kg para controlar la humedad y a_w obtenidas luego de la deshidratación.
La humedad se determinó por triplicado a través del método de Dean y Stark, 1920. Para ello, se utilizaron 10 g de muestra y se midió el volumen de agua liberado por las ciruelas durante la destilación con tolueno. Los resultados se expresaron en porcentaje de humedad, empleado la fórmula: Humedad (%) = V x 10 (siendo V = volumen de agua medido en el colector graduado).
La a_w se determinó por triplicado mediante el equipo Rotronic Hygropalm. Cada muestra se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm^3 y se colocó en una cápsula plástica PS-40, llenándola hasta la mitad de su altura. La medición se realizó con el programa "a_w quick" a temperatura controlada de 20°C.
Se tomaron imágenes de las ciruelas deshidratadas por ambos métodos con un microscopio digital con pantalla LCD "Biotraza" XSP-167SP.

2.3. Tiernizado de las ciruelas deshidratadas (rehidratación)

Las ciruelas deshidratadas se tiernizaron con agua y vapor en una olla a presión (capacidad 5 L, diámetro 24 cm, altura 12 cm, presión 186 kPa y temperatura 116ºC). El tiempo total del tratamiento térmico fue de 11 minutos. Posteriormente, las ciruelas tiernizadas se escurrieron y se descarozaron en forma manual.

2.4. Tratamientos aplicados

Para cada método de secado (sol y horno) se aplicaron 9 tratamientos con 3 repeticiones de 20 ciruelas tiernizadas cada uno.

Tabla 12: Tratamientos aplicados a las ciruelas tiernizadas.

	Tratamiento	Concentración (%)	Tiempo (s)
Inmersión en 400 ml de solución de sorbato de potasio con agitación a temperatura ambiente.	1	2,0	10
	2	2,0	20
	3	2,0	30
	4	2,5	10
	5	2,5	20
	6	2,5	30
	7	3,0	10
	8	3,0	20
	9	3,0	30

Para realizar los ensayos se empleó sorbato de potasio p.a. (título mínimo 99%). Luego de efectuar los tratamientos, las ciruelas se colocaron en recipientes cerrados herméticamente durante 24 horas para su estabilización.
Se evaluó humedad, aw (con las técnicas anteriormente mencionadas) y el contenido de sorbato de potasio residual mediante la técnica International Standard ISO 5519:2008 Fruits, vegetables and derived products - Determination of sorbic acid content. En la cual se extrajo cuantitativamente el sorbato de potasio de las ciruelas tiernizadas por destilación con arrastre de vapor. El sorbato de potasio presente en el destilado se determinó mediante una lectura espectrofotométrica en el rango UV.

2.5. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo, et al., 2016) y MATLAB & Simulink – MathWorks (versión 2017).

3. Resultados y Discusión

3.1. Deshidratación

En la Tabla 2 se observa el contenido de humedad y la a_w de las ciruelas d'Agen deshidratadas al sol y en horno.

Tabla 13: Humedad y a_w de las ciruelas deshidratadas al sol y en horno.

Parámetro	Ciruelas secadas al sol	Ciruelas deshidratadas en horno
Humedad (%)	20,2 ± 1,8	20,0 ± 1,5
Actividad acuosa (20ºC)	0,63 ± 0,05	0,62 ± 0,03

Mediante un análisis de la varianza (prueba LSD de Fisher utilizando α=0,05) se comprobó que la humedad y la a_w no presentaron diferencias estadísticamente significativas (p=0,8896; p=0,7812).

3.2. Tratamientos aplicados

En la Tabla 3 se observa la humedad y aw determinada luego del tiernizado.

Tabla 14: Humedad y a_w de las ciruelas deshidratadas al sol y en horno luego del tiernizado.

Parámetro	Ciruelas secadas al sol	Ciruelas deshidratadas en horno
Humedad (%)	33 ± 1	31 ± 2
Actividad acuosa (20ºC)	0,830 ± 0,020	0,801 ± 0,030

Se realizó un ANAVA (prueba LSD de Fisher utilizando α=0,05) para comparar las humedades obtenidas luego del tiernizado en las ciruelas deshidratadas al sol y en horno y se obtuvo un valor de p<0,0001. Por lo tanto, al ser p<0,05, existieron diferencias significativas entre las humedades para ambos métodos de secado. El secado de ciruela al sol obtuvo una humedad media de 33,11%, mayor que la del deshidratado en horno (31,22%). Este resultado permitió concluir que al emplear secado solar, la capacidad de rehidratación de las ciruelas es mayor (aproximadamente 2%). Este fenómeno podría atribuirse a un mayor deterioro en la estructura celular de las ciruelas debido a que el secado solar depende de las condiciones climáticas, por lo cual es un proceso prolongado y de temperaturas oscilantes.
Del mismo modo, se realizó un ANAVA (prueba LSD de Fisher utilizando α=0,05) para comparar las aw y se obtuvo un valor de p<0,0001. Por lo tanto, también existieron diferencias significativas entre las aw para ambos métodos de secado.
En la Tabla 4 a y b se exhiben los resultados de las determinaciones del contenido de sorbato de potasio residual en ciruelas deshidratadas al sol y en horno.

Tabla 15 a: Contenido de sorbato de potasio residual en ciruelas deshidratadas al sol.

CIRUELAS SECADAS AL SOL				
Concen-tración (%)	**Tiempo (s)**	**Sorbato de potasio residual (ppm)**	**Promedio (ppm)**	**Desviación Estándar (ppm)**
2,0	10	1342	1269	183
		1061		
		1405		
2,0	20	1359	1498	121
		1555		
		1580		
2,0	30	1295	1398	105
		1393		
		1505		
2,5	10	1152	1118	200
		903		
		1298		
2,5	20	1677	1581	172
		1683		
		1382		
2,5	30	1514	1525	65
		1595		
		1467		
3,0	10	1743	1771	26
		1778		
		1793		
3,0	20	1815	1596	192
		1512		
		1460		
3,0	30	1846	1927	86
		1919		
		2017		

Tabla 16 b: Contenido de sorbato de potasio residual en ciruelas deshidratadas en horno.

CIRUELAS DESHIDRATADAS EN HORNO				
Concen-tración (%)	**Tiempo (s)**	**Sorbato de potasio residual (ppm)**	**Promedio (ppm)**	**Desviación Estándar (ppm)**
2,0	10	571	472	95
		382		
		464		
2,0	20	628	560	182
		354		
		698		
2,0	30	696	811	106
		905		
		831		
2,5	10	792	843	116

		976		
		761		
2,5	20	915	856	67
		783		
		871		
2,5	30	786	771	99
		665		
		862		
3,0	10	1167	1121	126
		1217		
		978		
3,0	20	1117	1131	94
		1232		
		1045		
3,0	30	1204	1240	192
		1448		
		1069		

El Artículo 916 bis - (Resolución Conjunta RESFC-2019-5-APN-SRYGS#MSYDS Nº5/2019) del Código Alimentario Argentino permite el tratamiento superficial de frutas tiernizadas con ácido sórbico o sorbato de potasio siempre que el contenido residual (expresado en ácido sórbico) no exceda los 1.000 mg/kg (1.000 ppm). Por lo tanto, como se puede observar en la Tabla 5, el 78% de los tratamientos aplicados a las ciruelas tiernizadas que fueron deshidratadas al sol no cumplen con la especificación.

Tabla 17: Contenido de ácido sórbico promedio en ciruelas deshidratadas al sol y horno.

CIRUELAS SECADAS AL SOL		
Concentración (%)	**Tiempo (s)**	**Promedio Ácido sórbico (ppm)**
2,0	10	927
2,0	20	1126*
2,0	30	1051*
2,5	10	840
2,5	20	1188*
2,5	30	1147*
3,0	10	1332*
3,0	20	1200*
3,0	30	1449*
CIRUELAS DESHIDRATADAS EN HORNO		
2,0	10	355
2,0	20	421
2,0	30	610
2,5	10	634
2,5	20	644
2,5	30	580
3,0	10	843
3,0	20	851
3,0	30	933

* Valores superiores a 1.000 ppm

3.3. Análisis de los resultados

Se realizaron gráficos de superficie (Figuras 1 y 2) para representar el contenido de sorbato de potasio residual determinado, en función de la concentración de la solución utilizada y el tiempo de aplicación (z=f(x,y)) para ciruelas deshidratadas al sol y en horno. Para ello se realizó una interpolación cúbica empleando el comando "griddata" de Matlab.

En las superficies obtenidas, los valores de z(sorbato de potasio residual) se obtienen mediante la evaluación de f(concentración, tiempo) para los correspondientes puntos del plano (x=concentración, y=tiempo).

Los contenidos más elevados de sorbato de potasio residual, tanto para ciruelas deshidratadas al sol como en horno, se encuentran en la esquina superior derecha de los gráficos, que coinciden con altos valores de concentración y tiempo de aplicación.

A su vez, los valores más bajos de conservante residual obtenido, se encuentran en el centro del gráfico para ciruelas secadas al sol (Figura 1), y en la esquina inferior izquierda para ciruelas deshidratadas en horno (Figura 2), que coinciden con valores bajos de concentración y tiempo utilizados.

Se puede observar que el sorbato de potasio residual en las ciruelas deshidratadas en horno es menor (para iguales concentraciones y tiempos) y más homogéneo (lineal) que en las ciruelas secadas al sol.

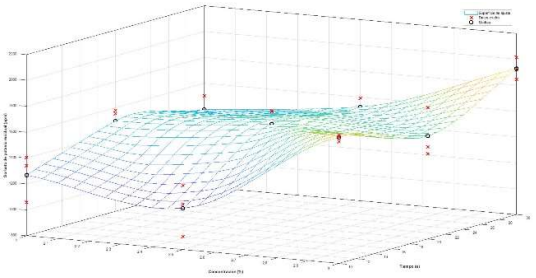


Figura 12: Gráfico de superficie para el contenido de sorbato de potasio residual en función de la concentración de la solución utilizada y el tiempo de aplicación para ciruelas deshidratadas al sol.

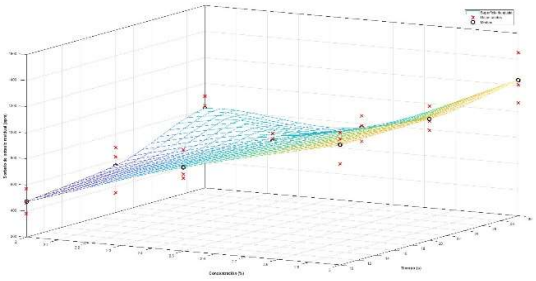


Figura 2: Gráfico de superficie para el contenido de sorbato de potasio residual en función de la concentración de la solución utilizada y el tiempo de aplicación para ciruelas deshidratadas en horno.

Se realizaron gráficos de contorno o curvas de nivel (Figuras 3 y 4) para ayudar a visualizar los datos de los gráficos de superficie presentados anteriormente. Estas curvas se caracterizan por ser puntos (x,y) sobre los cuales el valor de z=f(x,y) es constante. Cuando el espacio entre las curvas de nivel es grande, la tasa de variación del contenido de sorbato de potasio residual es baja, mientras que un espaciado pequeño indica un rápido cambio de concentración. Éstos gráficos son útiles para estudiar los niveles de los factores en los cuales se produce un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta. Para representar los gráficos de contorno o curvas de nivel se utilizó el comando "contour" en Matlab.
Las ciruelas secadas al sol (Figura 3), presentan una distribución de conservante heterogénea, sin un orden lógico de absorción.
En el caso de las ciruelas deshidratadas en horno (Figura 4) se puede observar que a medida que aumenta la concentración de la solución utilizada y el tiempo de aplicación, aumenta el contenido de sorbato de potasio residual. Para no exceder las 1.000 ppm de ácido sórbico permitidas (equivalentes a 1.330 ppm de sorbato de potasio) no se deberían utilizar soluciones con una concentración mayor a 3% durante 30 segundos.

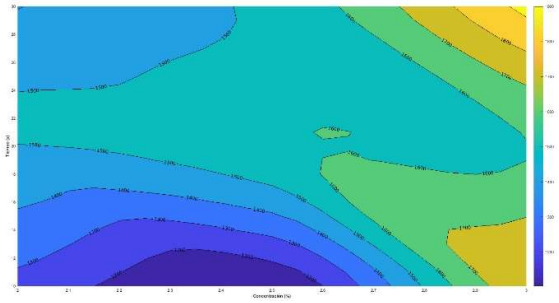


Figura 3: Gráfico de contorno o curvas de nivel para el contenido de sorbato de potasio residual en función de la concentración de la solución utilizada y el tiempo de aplicación para ciruelas deshidratadas al sol.

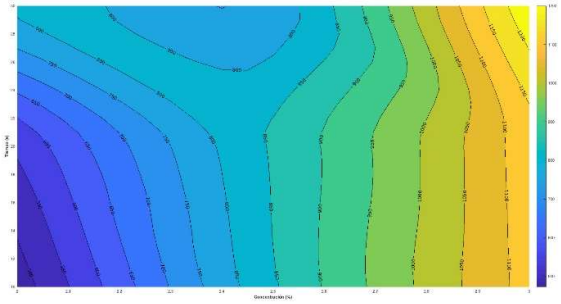


Figura 4: Gráfico de contorno o curvas de nivel para el contenido de sorbato de potasio residual en función de la concentración de la solución utilizada y el tiempo de aplicación para ciruelas deshidratadas en horno.

Se realizó un ANAVA (prueba LSD de Fisher utilizando α=0,05) para comparar el contenido de sorbato de potasio residual en las ciruelas deshidratadas al sol y en horno y se obtuvo un valor de $p<0,0001$. Por lo tanto, al ser $p<0,05$, existieron diferencias significativas en el residuo del conservante. El secado de ciruelas al sol obtuvo un valor medio de 1.520 ppm mientras que, las deshidratadas en horno 867 ppm. Esto podría atribuirse a daños en la piel de las ciruelas.
En la figura 5 se exhiben imágenes de las ciruelas deshidratadas por ambos métodos, tomadas con un microscopio digital. Las ciruelas secadas al sol presentaron daños en piel (a) y oxidaciones en pulpa (b), mientras que en las deshidratadas en horno no se observaron éstos fenómenos.

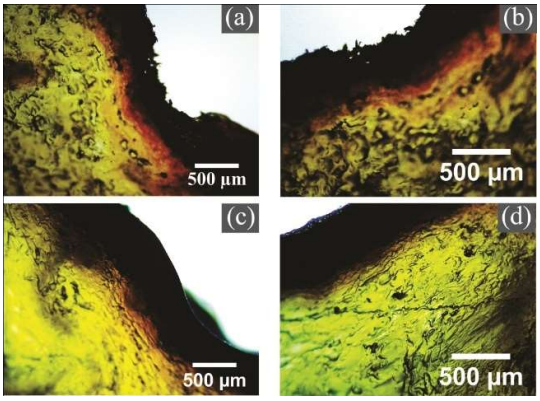


Figura 5: Microestructura de la piel de las ciruelas deshidratadas al sol y en horno.
Detalle de ciruelas secadas al sol a) piel y b) pulpa.
Detalle de ciruelas deshidratadas en horno c) piel y d) pulpa.

4. Conclusiones

Las ciruelas secadas al sol tienen una capacidad de rehidratación mayor que las deshidratadas en horno. A su vez, presentan mayor absorción de sorbato de potasio, con una distribución heterogénea. Esto podría atribuirse a daños en la piel de las ciruelas ocasionados por largos períodos de secado y oscilaciones térmicas.

5. Agradecimientos

Al Doctor en Ingeniería Química Mario D. Ninago, Investigador Adjunto de CONICET y docente de la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria UNCuyo, por realizar las imágenes de la piel de las ciruelas.

6. Referencias

Administración Nacional De Medicamentos, Alimentos Y Tecnología Médica (ANMAT). Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. Código Alimentario Argentino. Capítulo XI (actualizado al 02/2019): Artículo 916 bis. (https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_xi_vegetalesactualiz_2019-2.pdf; verificado: 04/abril/2019).

Chichester D. F., Tanner F. W., 1973. Chapter 3: Antimicrobial Food Additives – Sorbic Acid and its salts. CRC Handbook of Food Additives, Second Edition, Volume I. Edited by FURIA T. E. CRC Press ISBN 9780849305429. 1016 pp.

Dean E. W., Stark D. D. 1920. A Convenient Method for the Determination of Water in Petroleum and Other Organic Emulsions. Industrial & Engineering Chemistry, 12(5), 486–490.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (http://www.infostat.com.ar; verificado 22/marzo/2019)

International Organization For Standardization. 2008. ISO 5519:2008 Fruits, vegetables and derived products. Determination of sorbic acid content. Second edition.

Lück E., Jager M., 1997. Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects. 2nd revised and enlarged edition, Springer Science & Business Media. 262 pp.

Sofos J N., Pierson M. D., Blocher J. C., Busta F. F., 1986. Review: Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. International Journal of Food Microbiology, 3 pp 1-17.

Sofos J. N., 2000. Chapter 23: Sorbic Acid. Natural Food Antimicrobial Systems. Editor Naidu A. S. CRC Press Boca Ratón London New York Washington DC. ISBN 0-8493-2047-X. 818 pp.

Somogyi L. P., 2005. Chapter 21: Plums and Prunes. Processing Fruits Science and Technology Second Edition. Editors Barret D. M., Somogyi L. P., Ramaswami H. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. ISBN 0-8493-1478-X. 841 pp.

Stopforth J. D., Sofos J. N., Busta F. F., 2005. Chapter 3: Sorbic acid and sorbates. Antimicrobials in Food, Third Edition. Edited by Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L. CRC Press, Boca Raton, FL, 49-91 ISBN 9780824740375, 720 pp.

Urfalino, D.P.; Jofré, V.; Assof, M.; Daniele, M. Y Quiroga, A. 2008. Comparación en contenidos de fenoles, flavonoides totales y color de pulpa en ciruela D'agen deshidratada a horno y a sol. XXXI Congreso Argentino de Horticultura Mar del Plata.

36TCA - Acacia negra: Planta silvestre con potencial alimenticio

Acacia negra: wild plant with nutritional potential

Maria Cristina Cayetano[1], Andreina Stefani Leal[1], Mariana Acosta[2], Manuela Peralta[2], Franco Spinelli[1], Trinidad Wicky[1].

1. Facultad de Ciencias de la Alimentación. Mons. Tavella 1450. Concordia. Entre Ríos.
2. Asociación Civil "Luz del Ibira".
   E-mail: cristina.cayetanoarteaga@uner.edu.ar

Resumen

En la región, la “acacia negra” (*Gledistsia tricanthos*) es considerada una planta silvestre invasora cuya propagación descontrolada representa un problema ambiental por su capacidad colonizadora agresiva de los espacios naturales, afectando la biodiversidad y el uso del suelo. Se plantea investigar el potencial alimenticio de las vainas de acacias, basados en experiencias reportadas por la asociación civil Luz del Ibirá. En este trabajo se describe la obtención de harinas integrales de vainas de acacias y harinas sin semillas. Se determinó contenido de proteínas, fibras, grasas, cenizas, carbohidratos y valor energético. La ausencia de prolaminas en las harinas obtenidas fue comprobada mediante ensayos inmunoenzimáticos. Las harinas de acacia negra constituyen un alimento nutricionalmente valioso que aporta energía debido a su alto contenido en carbohidratos, un contenido proteico apreciable, rico en fibras, con contenido en grasas no detectado y libre de gluten. Podrán ser utilizadas como materia prima o ingrediente para formulaciones de nuevos productos, como complemento alimenticio en poblaciones con necesidades nutricionales y aportará a la solución de un problema ambiental.

Palabras clave: acacias negras, harinas, perfil nutricional.

Abstract

The black acacia (*Gledistsia tricanthos*) is locally considered an invasive wild plant whose disproportionate propagation results in an environmental issue due to its aggressive capability of colonizing natural habitats, compromising biodiversity and land use. The project aims to research the nutritional potential of the acacia pod based on empirical data offered by the non-profit organization *Luz del Ibirá.* This paper describes the process of collecting acacia pod wholemeal flour and seed-less flour. The research defines the content of protein, fibre, fat, ashes, carbohydrates and energetic value. The absence of prolamim in the flour obtained was tested through an enzyme-linked immunosorbent assay. The black acacia flours serve as a nutritionally valuable food, which provides energy owing to their high carbohydrates content, their considerable protein levels, and their richness in fibre, as well as to their non – detectable fat content and their gluten-free quality. These goods can be used as raw materials or as a nutritional component in new food productions; they can also be used as a dietary solution for malnourishment. As a result, this would contribute to solving an environmental issue.

Keywords: acacias negras, flour, nutritional profile.

1. Introducción

Por miles de años, la alimentación humana ha estado basada en el consumo de una gran variedad de plantas. Esta diversidad de plantas sostenía la vida humana, y garantizaba una mejor nutrición, salud, soberanía alimentaria, diversidad en los cultivos, entre otros beneficios. No existe una lista completa de todas las plantas comestibles del mundo, pero varios estudios señalan que normalmente del 10% al 25% de la flora de una región es potencialmente comestible (Rapoport, 2007).

Actualmente, nuestra alimentación está basada en una pequeña variedad de alimentos. Menos de 200 cultivos contribuyen de manera sustancial a la producción alimentaria mundial y, tan sólo nueve representan el 66 % del total de la producción agrícola (Duarte, 2020). Por otra parte, los patrones de alimentación tienen un impacto significativo no solo en la salud sino también en el medio ambiente. Recientemente se ha originado una amplia discusión con respecto a la sostenibilidad de la producción de los alimentos que se consumen, dado que la producción, el mercadeo y el consumo de las diferentes fuentes de nutrientes de la dieta tienen diferentes efectos sobre la biodiversidad, el uso del agua y de la tierra, el cambio climático, la salud humana y el bienestar animal (Hartmann & Siegrist, 2017).

Resulta necesario realizar investigaciones sobre el potencial alimenticio de especies silvestres en desuso o desconocidas, que pueden ser complementos nutritivos. La disponibilidad de estas plantas al alcance de la mano, promueve la soberanía alimentaria y el acceso de poblaciones con carencias nutricionales a fuente de posibles sustitutos o complementos alimenticios. En la Universidad Nacional de Comahue, Bariloche, investigadores del laboratorio Ecotono (Rapoport, 2009), contribuyen desde 1989 a la generación de conocimiento científico en el campo de la Ecología; registraron 1,3 toneladas por hectárea de fitomasa comestible. En La Rioja se han registrado plantas alimenticias, formas de recolección, partes aprovechadas y preparaciones culinarias utilizadas por comunidades rurales (Biurrum, et al, 2007). La Asociación Civil "Luz del Ibirá" (N° de Personería Jurídica 2.166.581) de Concordia, tiene como objetivo principal la organización, promoción y desarrollo de eventos, actividades y acciones culturales y educativas de temáticas ambiental (https://luzdelibira.com.ar/conocenos/) y entre otros propósitos, plantea recuperar el valor "comida" que tienen las plantas silvestres que se encuentran en el corredor litoral del río Uruguay. Esta es una región privilegiada porque recibe aportes de miles de especies de la mata atlántica brasileña, del Chaco, de los pastizales pampeanos, que llegan por dispersión hidrócora y son depositadas en cada creciente del río sobre las costas. La vegetación que acompaña al río Uruguay y sus afluentes, corresponde al denominado bosque en galería, bosque ribereño o selva en galería, ecosistemas dinámicos dispuestos sobre la planicie de inundación del río, donde reciben el aporte permanente de propágulos y semillas y presentan una capacidad de resiliencia alta, permitiendo la regeneración de las especies que lo conforman. El pulso de inundación es una característica ecológica importante que, junto a la humedad y fertilidad del suelo, ayuda a mantener esa dinámica (Rodríguez *et al*, 2018).

Figura 13. Árbol de acacias negras

En este entorno se ha desarrollado con notable facilidad la conocida como "acacia negra" o "espina de Cristo" cuyo nombre científico es *Gleditsia triacanthos* L. Su hábitat preferido es el suelo húmedo y fértil por lo que crece asociada a las llanuras de inundación y a los bancos de ríos y arroyos (Base de datos de Invasiones Biológicas en Uruguay, 2011). El árbol de acacia negra (figura 1) alcanza alturas de 10 a 25 m, presenta corteza grisácea, rugosa con espinas rojizas, de ahí su nombre, "tricanthos" que significa tres espinas. Florece en noviembre-diciembre y fructifica de diciembre a marzo. Esta especie es considerada una invasora exitosa ya que posee características que favorecen su rápida expansión, por ejemplo, u reproducción es por lo general a partir de semillas que se producen en grandes cantidades y se mantienen viables por más de 20 años (Csurhes y Markula, 2010); su rápido crecimiento (60 cm/año), alta tasa de emergencia, período juvenil corto (Marco & Páez, 2000), responde bien en cualquier tipo de suelo y pH (Base de datos de Invasiones Biológicas en Uruguay, 2011). Modifican el paisaje natural ya que esta especie crece mejor en sitios perturbados a pleno sol como son las zonas inundables, generando impactos ecológicos importantes, desplazando a especies nativas, provocando cambios en la estructura de la comunidad (Vilches *et al*., 2014).

Relevamientos y experiencias llevados a cabo por los integrantes de la ONG Luz del Ibirá, muestran que sería posible aprovechar los frutos de acacia negra para otras actividades, como la obtención de alimentos, y sería una forma sustentable de controlar su propagación, transformando así un problema ambiental en una oportunidad. No se encuentran antecedentes sobre el aprovechamiento de acacias negras para productos alimenticios, aunque se describe como fruto forrajero y comestible (Rodríguez *et al*., 2018). Como antecedente más aproximado, se encuentra la harina de algarrobo. Algarrobo es el nombre común para los árboles de Prosopis en Sudamérica y sus frutos o vainas son llamados algarrobas. A partir del secado y molienda de las vainas, se obtiene la harina de algarroba, ampliamente utilizada, especialmente por comunidades regionales del noroeste (NOA) del país con la que elaboran todo tipo de panificados (Sciammaro, 2015; Correa *et al*, 2017). Se ha desarrollado un sucedáneo del café a partir de harina de algarroba (Prokopiuk, 2004). Las investigaciones sobre las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales de vainas y harinas derivadas del fruto han demostrado la versatilidad del fruto del algarrobo por sus múltiples usos en alimentos de diversa naturaleza. A su aplicación en la preparación de productos regionales tradicionales se suma su potencial como materia prima para la elaboración de productos panificados (Bigne, 2016; Correa et al, 2017) y para necesidades específicas como los destinados a dietas para personas celíacas (Sciammaro, 2015). El sector industrializador y comercializador de "otras" harinas" cuenta con un gran potencial. La innovación por parte de la industria alimentaria muestra clara avidez por la demanda de ingredientes que permitan presentar nuevos sabores y elaborar productos saludables (Lezcano, 2014).

Este trabajo plantea describir el perfil nutricional de las harinas obtenidas por secado y molienda de vainas integrales y vainas sin semillas de acacias negras.

2. Materiales y métodos

2.1 -Recolección y acondicionamiento de vainas de acacia negra

La acacia florece generalmente a finales de la primavera obteniendo sus vainas las condiciones óptimas de madurez a mediados del otoño. La recolección de las vainas se llevó a cabo entre el mes de mayo y junio de árboles ubicados dentro del departamento Concordia, en zona del parque San Carlos y la costanera sobre el río Uruguay.

Estas vainas se clasificaron y seleccionaron (vainas enteras, sin picaduras de aves, rotas o fracturadas). Luego de recogidas se lavaron con agua potable y cepillo para quitar el polvo e impurezas superficiales y se secaron al sol. Se almacenaron en cajas de cartón, con papel absorbente hasta su procesamiento.

Se prepararon dos lotes para la obtención de harinas: de uno se separaron manualmente las semillas de acacias para obtener harina de vainas de acacia sin semillas (HSS) y el otro lote para obtener harina integral de vainas de acacia (HCS).

Se determinó humedad inicial de las vainas en balanza de determinación rápida BOECO, tomando muestras de 5 vainas cada una, que fueron finamente divididas con cuchillos, de donde se tomaron 5,00 g para cada determinación.

La etapa de secado de las vainas se realizó en secadero de bandejas con circulación forzada de aire, a temperatura controlada de 40°C (para simular secado al sol), hasta peso constante.

2.2 - Obtención de harinas de acacia negra

Para la obtención de harinas se procesaron muestras de vainas completas, y vainas sin semillas. Las semillas fueron separadas manualmente, previo al secado como se indicó anteriormente. Se obtuvieron dos tipos de harinas: harina integral, (HCS) y harina sin semillas (HSS). Para la molienda se utilizó molinillo eléctrico de laboratorio. Las harinas obtenidas se envasaron en bolsas aptas termoselladas.

2.3- Determinaciones analíticas

Para la caracterización nutricional de las harinas se realizaron los siguientes ensayos:

Proteínas: Se determina por el método de Kjeldahl utilizando Digestor FOSS TECATOR y 2200 KJELTACC Auto Distillation. En este método se determina el contenido total de nitrógeno (N) tras digerir la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado en presencia de sulfato de cobre y sulfato de sodio como catalizadores. El N orgánico pasa a amoníaco (que queda retenido como sulfato de amonio). Por neutralización con NaOH 32% p/v y destilación se libera el NH3 y se recoge en medio ácido (solución de ácido bórico 4% p/v). Para determinar el punto final de la titulación, se emplea el indicador de Mortimer. La cantidad de proteínas se calculó utilizando la fórmula siguiente:

Proteína = contenido total de nitrógeno (Kjeldahl) x factor.

Se utilizó 5,75 como factor de conversión de porcentaje de nitrógeno a porcentaje de proteína, valor recomendado para proteínas vegetales (MERCOSUR/GMC/RES. Nº 46/03).Se expresa en contenido porcentual.

Grasas: Se determinan por el método de Soxhlet en equipo 2055 SOXTEC FOSS Tecator. Las muestras se pesan en cartuchos armados con papel de filtro; el equipo de extracción consta de un extractor en el cual se introduce el cartucho, un refrigerante que impide la evaporación del solvente y un balón en el cual se recoge la muestra. Para la extracción se utiliza éter de petróleo y se realizaron siete sifonadas por muestra, lo que se considera suficiente para una extracción satisfactoria. Luego se evapora el solvente de los balones y se pesa para obtener el extracto etéreo. Se expresa en contenido porcentual (AOAC 963.15).

Fibra bruta: se determinó residuo orgánico después de la digestión acida y básica, utilizando equipo DOSI FIBER (AOAC 962.09).

Humedad: determinación de humedad en harinas (AOAC 925.10).

Cenizas: Se determina en mufla BIOBASE ME4-10GJ, colocando las muestras de harina pesadas en balanza analítica hasta calcinación. Se expresa contenido porcentual (AOAC 900.2).

Hidratos de carbono: Se calcula como la diferencia entre 100 y la suma del contenido de proteínas, grasas, fibra alimentaria, humedad y cenizas.

Valor energético: según factores de conversión establecidos por la resolución GMC Nº 46/03; Hidratos de carbonos y Proteínas: 4 kcal/g (17kJ/g) Grasas: 9 kcal/g (37kJ/g); Fibra: 2 kcal/g (8,5 kJ/g).

Determinación de Gluten: por enzimoinmunoensayo ELISA, utilizando Kit Ridascreen Gliadin r-Biopharm, Germany. Límite de detección 1mg/kg.

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado, y los resultados se calcularon sobre base seca, expresándose como promedio y desviación estándar Las variables fueron analizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el test de Tukey para comparar la varianza de los valores medios, con un nivel de significancia $p<0,05$, empleando software Statgraphics Centurion XV versión 2.15.06 (StatPoint Technologies, Estados Unidos).

3. Resultados y Discusión

El secado de las vainas con semillas resulto más prolongado y no se alcanzó a reducir la humedad a niveles tan bajos como los logrados con las vainas sin semilla, lo que se ve reflejado en las humedades de las harinas respectivas (tabla 1). La molienda de vainas sin semillas resultó más rápida y sencilla. Cuando se procesaron las vainas con semillas, el tiempo de molienda fue mayor, por lo tanto, el consumo energético también, y la exposición de las vainas a mayores temperaturas, que pueden afectar su estabilidad.

Tabla 18. Humedad de las harinas de acacias negras

Harina	HCS	HSS
Humedad	9,67±0,06	3,7±0,14

Las harinas obtenidas reportaron valores de humedades (Tabla 1) que pueden considerarse en el rango de los aceptados en el Código Alimentario Argentino para otras harinas (Capítulo IX), donde se establece por ejemplo para la harina de algarroba un contenido máximo de 10%. La humedad es un criterio fundamental en la obtención de harinas de cualquier tipo, ya que influye en su conservación y vida útil.

Tabla 19. Composición nutricional de las harinas de acacias negras.

HARINA DE ACACIAS	1-HCS	2-HSS
PROTEINA (g/100g)	7.20±0.20 a	3.6±0.11 e
CARBOHIDRATOS (g/100g)	56.10±5.5	66.6±1.3
GRASA (g/100g)	N/D	N/D
FIBRA (g/100g)	23.7±4.97 c	22.2±3.1 c
CENIZA (g/100g)	3.3±0.35 d	3.8±0.21 d
VALOR ENERGETICO (kcal/100g)	253	282

letras iguales en la misma fila indican que no existe diferencia significativa (Tukey, p = 0,05).

En la tabla 2 se presentan los resultados del perfil nutricional de las harinas de acacias, integral y sin semillas, expresados en g/100 g de base seca.

Las harinas con y sin semillas mostraron diferencias estadísticamente significativas

únicamente en el contenido de proteínas, como era de esperar, evidenciando que las semillas contienen la mayor parte del contenido proteico de las vainas, que también fue reportado por Sciammaro *et al* (2015) para las vainas y harinas de algarroba. Las determinaciones de contenidos de proteínas para harinas de algarroba muestran valores de 3,53 hasta 9,0 g/100 g (Silva *et al*, 2007; Sciammaro *et al*, 2015, Bigne, 2016). Por tanto, los valores de proteína en las especies estudiadas se asemejan a los reportados en la literatura para harinas de algarroba. (Andrade *et al*., 2009; González Galán *et al*., 2008; Bernardi, *et al*., 2006; Prokopiuk, 2004; Felker *et al*., 2003). Analizando los valores diarios de referencia de nutrientes VDR (Cap. V-CAA), la ingesta de 100g de la HCS estaría cubriendo un 9.61% del VDR y la HSS un 4.81% del VDR. Considerando el concepto de complementariedad (Bohrer, 2017; Caire-Juvera *et al*., 2013; Mariotti, 2017), donde se describe que las proteínas tienen la capacidad de complementarse entre sí, la harina de acacias podría oficiar como una nueva fuente de proteína vegetal. Los complementos de proteínas vegetales son consideradas una opción saludable que permite alcanzar las recomendaciones de ingesta establecidas para este macronutriente (Grooper *et al*,2009; Woolf *et al*, 2011).

El componente mayoritario de las harinas de acacias lo representan los carbohidratos, aportando al valor calórico. Es reconocido su sabor ligeramente dulce por lo que puede ser utilizado en panificados (Acosta, 2021) y en la industria de dulces (Rodríguez *et al*., 2018). Comparando con las harinas de algarroba,

Es elevado el contenido en fibras hallado en las harinas de acacias integral y sin semillas, como se observa en la tabla 2. Según la American Association of Cereal Chemists "la fibra alimentaria es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y otras sustancias asociadas de las plantas. La fibra alimentaria promueve efectos fisiológicos benéficos incluyendo atenuación del nivel del colesterol y/o atenuación en los niveles de glucosa en sangre" (AACC, 2000). El Código Alimentario Argentino (CAA) dispone en su Capítulo V (Normas para la Rotulación y Publicidad de los Alimentos) un Valor Diario de Referencia (VDR) para fibra alimentaria de 25 g/día. Así mismo establece en alimentos sólidos un contenido mínimo de 3 g de fibra/100 g para la rotulación del alimento como "fuente de fibra"; mientras que para la utilización del rótulo "alto contenido de fibra" se exige un contenido igual o mayor a 6 g de fibra/100 g . Tanto el contenido de fibra de la harina HCS como HSS cubren por cada 100 g de las mismas un 94,8% y un 79% de la ingesta diaria recomendada. Estos valores resultan similares a los reportados para garbanzos (21,2 g de fibra dietaria) (Acevedo Martinez *et al*; 2021).

En los ensayos realizados no se ha detectado contenido en grasas en las harinas de acacias. Este componente ha sido reportado en las harinas de algarroba en niveles desde 1,2% (Felker&Takeoka, 2013) hasta 3,78 % (Bigne, 2016).

Las semillas han quedado reservadas, se propone extraer gomas y aislados proteicos, e investigar sus propiedades funcionales. El aprovechamiento de las semillas, además, es condición para controlar de manera sustentable el problema ambiental que genera la propagación descontrolada de las acacias negras.

La ausencia de prolaminas (valor límite: 0,1 mg/100 g harina) en las harinas obtenidas fue comprobada mediante ensayos inmunoenzimáticos mostrando que las harinas de acacias negras constituyen un ingrediente apto para formulaciones de alimentos para celíacos, según el CAA art 1383. Se debe tener en cuenta al diseñar alimentos, que para denominar un producto como "libre de gluten", según el CAA, es necesario un análisis que corrobore su condición y un programa de buenas prácticas de fabricación que garantice su no contaminación en los procesos, desde la recepción de materias primas hasta la comercialización del producto final. Muchos alimentos libres de gluten son pobres en fibras (Felker *et al*, 2013), por lo que las harinas de acacias negras se podrían incorporar en las formulaciones de alimentos para celiacos.

En la actualidad, la industria alimentaria muestra un creciente interés por las leguminosas, por su valor nutritivo y por las propiedades funcionales que presentan sus harinas, que constituye la base funcional de formulaciones de productos novedosos.

4. Conclusiones

Las harinas de acacia negra constituyen un alimento nutricionalmente valioso, que aporta energía debido a su alto contenido en carbohidratos, un contenido proteico apreciable, rico en fibras, con contenido en grasas no detectado y libre de gluten. Puede ser utilizado como materia prima o ingrediente alimenticio para formulaciones de nuevos productos que

acompañen las tendencias en alimentación de productos saludables, y para dietas especiales como para celiacos. Por otra parte, pueden ser incorporadas en la dieta de poblaciones carenciadas, ya que se encuentran disponibles para su aprovechamiento al alcance de la mano, para lo cual es necesario educar a los consumidores, que conozcan acerca de los beneficios nutricionales que proporcionan, formas de recolección, acondicionamiento y preparación. El potencial alimenticio de las harinas de acacias negras esta para desarrollar.

5. Referencias

AACC International. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th ed. American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, 2000.

Acevedo Martinez, K.A.; Yang, M.M.; Gonzalez de Mejia, E.;(2021) *Technological properties of chickpea (Cicer arietinum): Production of snacks and health benefits related to type-2 diabetes*. Compr Rev Food Sci Food Saf.;20: 3762–3787. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12762

Acosta, M. (2021). *Silvestres comestibles de la A a la Z: curso completo con especies silvestres y no convencionales de la Región Neotropical*. 1a ed, Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Autores de Argentina, 2021.

Andrade-Montemayor, H.M., F.S Alegría-Ríos, M.Pacheco-López, J.H. Aguilar-Borjas, J.L.O Villegas-Díaz, R. Basurto-Gutierrez, H. Jimenez-Severiano &H.R. Vera-Avila. (2009). *Effect of dry roasting on composition, digestibility and degradability of fiber fractions of mesquite pods (Prosopis laevigata) as feed supplement in goats*. Tropical and Subtropical Agroecosystems 11(1): 237-243.

AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (17ma. ed.). Gaithersburg, USA.

Base de datos de Invasiones Biológicas en Uruguay. (2011). Gleditsia triacanthos. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Retrieved from http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas_de_especies/DATAonline/DBASEimpresiones/Gleditsia_triacanthos_i.pdf

Bernardi, C., S. Drago, N. Sabbag, H. Sanchez & M.Freyre. (2006). *Formulation and sensory evaluation of Prosopis alba (algarrobo) pulp cookies with increased iron and calcium dialyzabilities*. Plant Foods for Human Nutrition 61(1): 37-42.

Bigne, F. (2016) *Aplicación de Harina de fruto de algarrobo en el desarrollo de productos panificados saludables.* Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. https://doi.org/10.35537/10915/52428.

Biurrun E.; Galetto, L.; Anton A.M. & Biurrun, F. (2007). *Plantas silvestres comestibles utilizadas en poblaciones rurales de la Provincia de La Rioja (Argentina)*. Volumen especial de Etnobotánica, 33(I): 121-140

Bohrer, B.M.(2017) Review: *Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein.* Trends Food Sci Technol. ;65:103–12.

Caire-Juvera G, Vázquez-Ortiz FA, Grijalva-Haro MI.(2013) *Amino acid composition, score and in vitro protein digestibility of foods commonly consumed in Norhwest Mexico*. Nutr Hosp. ;28(2):365–71.

Código Alimentario Argentino (CAA) Ministerio de Agroindustria, Dir. Nac. Alimentos y Bebidas, Marco Regulatorio. https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario.

Correa, M.J.; Salinas, M.V.; Carbas, B.; Ferrero, C.; Brites, C; Puppo, M.C.(2017). *Technological quality of dough and breads from commercial algarroba–wheat flour blends.* J Food Sci Technol. DOI 10.1007/s13197-017-2650-4.

Csurhes, S. y A. Markula. (2010). *Honey locust tree: Gleditsia triacanthos.* Department of Employment, Economic Development and Innovation, Queensland Government, 17 pp.

Duarte, N. (2020). *Guía de Plantas alimenticias no convencionales en el Chocó Andino - (PANC*). Proyecto Factorías del Conocimiento en la Mancomunidad del Chocó Andino. Fundación Imaymana, AEXCID, AUPEX 82p.

Felker, P., N. Grados, G. Cruz & D. Prokopiuk. (2003).*Economic assessment of production of flour from Prosopis alba and P. pallida pods for human applications.* J. Arid Environ. 53: 517-528.

Felker, P; Takeoka G.; & Lan Dao (2013): *Pod Mesocarp Flour of North and South American Species of Leguminous Tree Prosopis (Mesquite)*:

Composition and Food Applications, Food Reviews International, 29:1, 49-66. http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2012.692139.

González Galán, A;, Duarte Corrêa, A;, Patto de Abreu, C.M. & Piccolo Barcelos, M.F. (2008). *Caracterización química de la harina del fruto de Prosopis spp. procedente de Bolivia y Brasil.* Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 58(3), 309-315. Recuperado en 30 de noviembre de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222008000300015&lng=es&tlng=es.

Grooper, S.S.; Groff, J.L.; Smith, J.L.(2009). *Advanced nutrition and human metabolism.* Quinta edición. Belmont: Wadsworth Cengage Learning.

Lezcano, E. (2014). *Las otras harinas*. Alimentos Argentinos, (63), 20-27. https://issuu.com/alimentosargentinos.gob.ar/docs/aa_63_issu/21.

Marco, D. y S. Páez. (2000). *Invasion of Gleditsia triacanthos in Lithraeae ternifolia montane forest of central Argentina*. Environmental Management, 26(4): 409-419.

Mariotti F. (2017) *Plant Protein, Animal Protein, and Protein Quality.* En: Mariotti F. Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention. Elsevier; 621–642.

Hartmann, C.; Siegrist, M. (2017) *Consumer perception and behaviour regarding sustainable protein consumption: A systematic review*. Trends Food Sci Technol. 61:11–25.

Prokopiuk, D. B. (2004). *Sucedáneo del café a partir de algarroba* (Prosopis alba Griseb). Universidad Politécnica de Valencia. Retrieved fromhttps://riunet.upv.es/handle/10251/1975?show=full

Rapoport, E. H. (2007). *Cuántas especies comemos y cuántas existen.* Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27759

Rapoport, E. H., Marzocca, A., & Drausal, B. S. (2009). *Malezas comestibles del Cono Sur y otras partes del planeta.* Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Rodríguez, E. E., Aceñolaza, P. G., Picasso, G., & Gago, J. (2018). *Plantas del bajo Rio Uruguay: árboles y arbustos. (1°).* Paysandú: Comisión Administradora del Río Uruguay(CARU).

Sciammaro, L. P. (2015). *Caracterización fisicoquímica de vainas y harinas de algarrobo (Prosopis alba y Prosopis nigra). Aplicaciones en productos horneados y fermentados*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Sciammaro, L; Ferrero, C.; Puppo, C.(2015). *Agregado de valor al fruto de Prosopis alba. Estudio de la composición química y nutricional para su aplicación en bocaditos dulces saludables*. Fac. Agron. Vol 114 (1): 115-123.

Silva CGM, Melo-Filho AB, Pires EF, Stamford TLM. *Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba* (*Prosopis* juliflora (Sw.) DC). Ciênc Tecnol Aliment. 2007; 27: 733-36

Vilches, C., Torremorell, A., Debandi, J., Castro, M. C. R., Rigacci, L., Zunino, E., Giorgi, A.(2014). *Efecto de la invasión de acacia negra (Gleditsia triacanthos L.) sobre arroyos pampeanos*. Biologia Acuatica, 30, 241–248.

Woolf, P.; Fu, L.L., Basu, A. (2011) *vProtein: Identifying Optimal Amino Acid Complements from Plant-Based Foods.* PLoS One;6(4):e18836. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018836

37TCA - Efecto de la molienda abrasiva sobre la composición y el rendimiento de los granos de quinoa.

Effect of abrasive grinding on the composition and yield of quinoa grains.

Yamila Sánchez[1,2], Luciana González[1,2], Maria Ana Loubes[1,2], Marcela Tolaba[1,2].

1. Universidad de Buenos Aires, FCEyN, Departamento de Industrias. Buenos Aires, Argentina.
2. CONICET – Universidad de Buenos Aires, ITAPROQ. Buenos Aires, Argentina.
   Email: mtolaba@di.fcen.uba.ar

Resumen

Se estudió el efecto del perlado sobre la composición centesimal de las semillas de quinoa y su relación con el rendimiento de la molienda y el tamaño de los granos. Se realizaron cinco tratamientos variando el tiempo de pulido (5-25 min) en un molino escala laboratorio, y un control sin tratar. Se determinó: rendimiento, área del grano, contenido residual de saponinas (por afrosimetría) y composición. El perlado ocasionó la reducción de la masa (28,5%) y del área (52%) al cabo de 25 min. A partir de 5 min no se detectó espuma, además, para este tiempo se obtuvo el mayor contenido de proteínas. Los granos presentaron un elevado contenido de fibra dietaria, cenizas y materia grasa, aún después de 25 min. Tanto el contenido de proteínas, como de minerales y de materia grasa se vio principalmente afectado a partir de 20 min por la remoción del embrión. Estos constituyentes del grano disminuyeron con el progreso de la molienda, lo que se correlacionó con la pérdida de rendimiento y de tamaño de las semillas. Contrariamente, el contenido de carbohidratos aumentó. Por lo tanto, la molienda abrasiva, un método sustentable, proporciona granos con calidad nutricional, empleando tiempos de proceso reducidos.

Palabras clave: saponinas, composición nutricional, proceso de perlado, análisis de imagen.

Abstract

The effect of pearling on the centesimal composition of quinoa seeds and its relationship with milling yield and grain size was studied. Five treatments were carried out varying the polishing time (5-25 min) in a laboratory-scale mill, and untreated control. It was determined: yield, grain area, the residual content of saponins (by afrosimetry), and composition. Pearling caused a reduction in mass (28.5%) and area (52%) after 25 min. After 5 min, no foam was detected, and the highest protein content was obtained at this time. The grains showed high content of dietary fiber, ash, and fat, even after 25 min. Protein, mineral, and fat contents were mainly affected after 20 min due to embryo removal. These grain constituents decreased with milling progress, which correlated with loss of yield and seed size. Contrarily, carbohydrate content increased. Therefore, abrasive grinding, a sustainable method, provides grains with nutritional quality, using reduced process times.

Keywords: saponins, nutritional composition, pearling process, image analysis

1. Introducción

La quinoa es un pseudocereal libre de gluten, de origen andino, con alto valor nutricional. Posee oligoelementos, vitaminas (es una fuente de vitamina E y de varias vitaminas del grupo B) y todos los aminoácidos esenciales, los cuales se encuentran en el núcleo del grano, a diferencia de los cereales que principalmente los contienen en el exosperma, como el arroz o el trigo. Asimismo, posee mayor proporción de proteínas y mejor valor biológico, en relación con los cereales, que le confieren una composición parecida a la de la caseína, proteína de la leche. Por tal motivo, la FAO catalogó a la quinoa como uno de los cultivos promisorios para la humanidad, no sólo por sus propiedades benéficas y sus múltiples usos, sino también por considerarla una alternativa para afrontar los problemas del hambre y de la seguridad alimentaria en el mundo (González Alemán, n.d.; Repo-Carrasco-V *et al*., 2007).

No obstante, los granos de quinoa no deben ser utilizados directamente en la elaboración de alimentos, dado que contienen en el pericarpio compuestos químicos antinutricionales termoestables: las saponinas. Estos compuestos determinan en gran parte el sabor amargo de las semillas, poseen una elevada capacidad de formación de espuma en solución acuosa, actividad hemolítica, forman complejos con el colesterol, afectan la absorción intestinal del zinc y del hierro, y son tóxicos para los peces (De Dios Elizalde *et al*., 2009).

Las saponinas pueden ser eliminadas de los granos, mejorando su aceptabilidad organoléptica, mediante lavados sucesivo con agua, lo que conlleva un alto costo energético y la contaminación de las aguas naturales; o por abrasión mecánica (Ahumada *et al*., 2016).

La molienda abrasiva es un proceso que genera por fricción la reducción del tamaño de los granos, y la eliminación de las saponinas por remoción del pericarpio (perlado). Su eficiencia implica maximizar el rendimiento del material molturado garantizando un producto de calidad nutricional. A su vez se genera un subproducto rico en saponinas que podría ser valorizado debido a sus propiedades biológicas (Ahumada *et al*., 2016). Sin embargo, existe muy poca información acerca de la influencia del perlado en la composición del grano y cómo se correlaciona dicha propiedad con las variables del proceso (Gómez-Caravaca *et al*., 2014).

Por lo expuesto, el objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del tiempo de la molienda abrasiva sobre la composición centesimal de los granos de quinoa y evaluar su relación con el rendimiento de la molienda y el tamaño de los granos.

2. Materiales y métodos

2.1. Molienda abrasiva

Se realizaron cinco tratamientos con 100 g de quinoa *Ayrampo* cada uno y un control sin tratar (0 min). Las muestras se procesaron en un molino de laboratorio Suzuki MT-95 (Brasil, ver Figura 1). Los granos (humedad 9,89 ± 0,5 g/100 g en base húmeda) permanecieron un tiempo variable (5 min, 10 min, 15 min, 20 min y 25 min) en la cámara pulidora, donde por abrasión perdieron parcial o totalmente el germen y el pericarpio, dependiendo de las condiciones del procesamiento.

2.2. Rendimiento de la molienda

El rendimiento de la molienda (R) se cuantificó en función de la masa inicial y final según:

$$R\ (\%) = g\ \text{quinoa pulida} \cdot 100/g\ \text{inicial de quinoa} \quad (1)$$

Se fraccionaron 2 g de cada muestra por triplicado y se almacenaron en frascos herméticos plásticos hasta su posterior análisis.

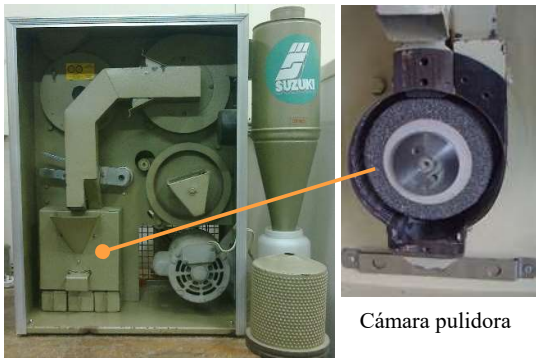


Figura 1. Molino abrasivo de laboratorio (Suzuki MT-95)

2.3. Área proyectada de los granos

El área proyectada de los granos se determinó por análisis de imágenes según la metodología propuesta por Loubes y Tolaba (2013) con algunas modificaciones. Cada muestra (2 g, 400-500 granos) por triplicado fue escaneada con una impresora multifunción (HP Deskjet 3050, Brasil) empleando un fondo blanco, junto con una escala milimétrica de referencia. Las imágenes digitales

en formato PNG (resolución de 1700 x 2338 pixeles) fueron analizadas con el programa ImageJ v.1.42q (National Institutes of Health, EE. UU.), obteniéndose así el área proyectada de los granos. Los resultados se expresaron como la mediana ± el desvío estándar (DS).

2.4. Contenido residual de saponinas

El contenido residual de saponinas se obtuvo mediante el método de la espuma. Se aplicó la técnica de estimación afrosimétrica (Koziol, 1991). Se pesaron 0,5 g de granos de quinoa (± 0,0001 g) en una probeta de 10 ml graduada (± 0,1 ml), se agregaron 5 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente durante 90 s en un dispositivo agitador Vortex (Decalab SRL, Buenos Aires, Argentina). La probeta se dejó reposar 5-10 s y se leyó la altura de la espuma, utilizando una regla con precisión de 0,1 cm. Los resultados se expresaron como el promedio de tres repeticiones por muestra.

2.5. Composición centesimal

La composición centesimal de los granos de quinoa tratados por molienda abrasiva y del control se determinaron por duplicado según los métodos oficiales (AOAC, 2000) y los carbohidratos se calcularon por diferencia. Los resultados se expresaron como la media ± DS.

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics Centurion v. XVI (Statistical graphics Corporation, EE. UU.). Se realizó estadística descriptiva y exploratoria de los parámetros de las muestras. Las diferencias significativas entre estos fueron determinadas por análisis de varianza simple (ANOVA), comparando las medias por la prueba de Tukey (HSD), a excepción del área proyectada, para la cual se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétricas) con su correspondiente prueba a posteriori, en todos los casos con un nivel de confianza del 95%. Para establecer posibles relaciones entre los parámetros evaluados se aplicó el análisis de correlación de Pearson.

3. Resultados y Discusión

3.1. Rendimiento de la molienda y área proyectada de los granos

En la Figura 2 se muestran granos seleccionados de los diferentes intervalos de molienda, así como las semillas sin tratar (0 min). Las capas externas del grano (pericarpio, escutelo) se eliminaron progresivamente conforme avanzó el tiempo de molienda, al cabo de 25 min de tratamiento algunos fragmentos o células de pericarpio todavía eran visibles. En esta instancia aún fue posible apreciar la remoción de fragmentos de embrión o germen (Fig. 3). La eliminación del embrión dejó un surco típico en la sección lateral de los granos (ya que el germen se localiza en forma anular y excéntrica en la semilla). A modo de comparación en la Figura 3 se pueden visualizar las semillas sin tratar (0 min) y los granos perlados luego de 25 min de molienda.

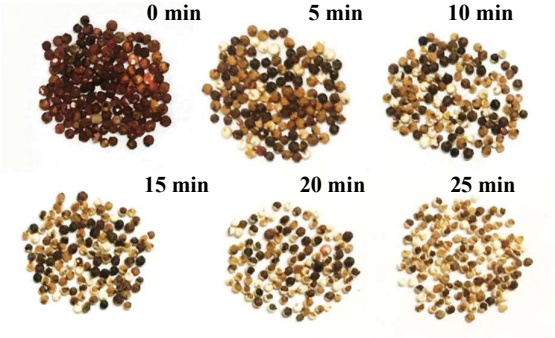


Figura 2. Aspecto físico de los granos de quinoa en función del tiempo de molienda abrasiva

Asimismo, el proceso de abrasión ocasionó una reducción creciente del diámetro de los granos de quinoa, encontrándose que se volvieron más globulares. Resultados similares fueron informados por D'Amico *et al*. (2019) quienes emplearon un molino abrasivo a escala de laboratorio para perlar quinoa, variando el tiempo de tratamiento entre 1-8 min.

Figura 3. Aspecto físico de los granos de quinoa control (0 min) y procesados por molienda abrasiva (25 min), la flecha señala un fragmento de embrión

De igual modo, el incremento del tiempo de proceso determinó una pérdida de rendimiento, el cual pasó del 91% a los 5 min de molienda a 71,5% al cabo de 25 min (Fig. 4), por una pérdida de masa del 9% (5 min) al 28,5% (25 min). Esta reducción de la masa de los granos estuvo asociada a una disminución del tamaño de las partículas, o área proyectada, determinada mediante análisis de imágenes. La misma varió de 2,51 ± 0,78 mm^2 (0 min) a 1,20 ± 0,39 mm^2 (25

min), con un porcentaje de merma del 12% (5 min) al 52% (25 min).

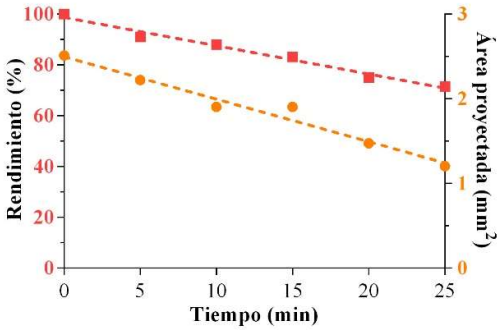


Figura 4. Rendimiento de la molienda y área proyectada de los granos de quinoa en función del tiempo de molienda abrasiva
Rendimiento = -1,115 Tiempo + 98,72; R^2 = 0,9816
Área = -0,05021 Tiempo + 2,497; R^2 = 0,9677

Dado que la pérdida de masa fue mucho menor en comparación con la reducción del área proyectada, principalmente a partir de los 10 min, puede inferirse que el embrión tuvo una densidad más baja en relación con el perispermo, contrariamente a lo observado por D'Amico *et al*. (2019). No obstante, estos autores no informaron la variedad de granos de quinoa empleada en la investigación, cualidad de gran importancia, ya que cada variedad botánica y agronómica posee caracteres tanto físico como químicos propios y distintivos (como tamaño, dureza, composición, entre otros) dentro de un mismo espécimen.

Por otra parte, el efecto del tiempo de molienda sobre el rendimiento y el área proyectada fue estimado satisfactoriamente (R^2 > 0,96) mediante un modelo lineal. Ambas respuestas se vieron afectadas de forma significativa y negativa por el parámetro de molienda evaluado. A su vez, mediante el análisis de la matriz de Pearson se encontró una correlación significativa y positiva entre el rendimiento y el área proyectada (r = 0,9744; p < 0,01).

3.2. Contenido residual de saponinas

Las saponinas, son heterósidos que constan de una parte glucídica (con uno o más azúcares) y de una genina (parte no glucídica) denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica (Tránsito López Luengo, 2001). Las saponinas son moléculas de alta solubilidad dada la estructura química que presentan, siendo la fracción glucídica la polar y responsable de esta propiedad (Gianna, 2013). Las saponinas de la quinoa son de estructura triterpenoide y se ha demostrado que las principales sapogeninas son el ácido oleanólico y la hederagenina (Koziol, 1991). La literatura reporta la identificación de más de 30 saponinas triterpénicas cuyas diferencias estructurales están asociadas a diferentes propiedades biológicas. Por otro lado, es importante tener en cuenta que las diferentes variedades de quinoa existentes y lugares de procedencia se asocian a distintos contenidos de saponinas (Ahumada *et al.*, 2016).

Los saponósidos se caracterizan por su capacidad para producir espuma (poder afrógeno) cuando se agitan en solución acuosa, debido a que disminuyen la tensión superficial del agua, es decir, son tensioactivos naturales (Tránsito López Luengo, 2001). Existen varios métodos para la cuantificación de las saponinas de la quinoa: afrosimétrico, hemolítico, volumétrico, espectrofotométrico y cromatográfico. De todos estos el más utilizado es el afrosimétrico (medición de la espuma) por ser una técnica sencilla, económica y rápida (Bergesse *et al.*, 2019).

En el presente trabajo sólo se detectó espuma (1,9 ± 0,3 cm) en la muestra sin tratar (0 min), indicando que la molienda abrasiva facilita la efectiva remoción de las saponinas al cabo de 5 min, gracias a que estas se concentran en las capas externas del grano (Reichert *et al*., 1986). Si bien la técnica afrosimétrica presenta limitaciones, realizada en condiciones estandarizadas es un indicador aproximado que se adapta fácilmente a su uso en el campo o en una planta de procesamiento y por tal motivo debe ser tenida en cuenta (Koziol, 1991).

Gómez-Caravaca *et al.* (2014) investigaron por el método cromatográfico el contenido residual de saponinas en granos de quinoa con niveles de pulido del 20-30%, y encontraron que con un 20% de perlado el contenido de saponinas disminuía más de un 50% y con 30% de perlado decaía más de un 79%, en relación al valor inicial.

En este estudio un grado de pulido del 12% (5 min), permitió una remoción superior al umbral de detección de saponinas (110 mg/100 g b.s.), informado en bibliografía para la quinoa (Koziol, 1991), indicando una baja concentración con tiempos de proceso reducidos.

3.3. Composición centesimal

Es sabido que la composición química de los granos de quinoa difiere según las variedades o ecotipos (Repo-Carrasco-V et al., 2007). Las semillas enteras de quinoa *Ayrampo* (0 min) presentaron valores medios de composición comparables a los datos bibliográficos (Abugoch James, 2009; Repo-Carrasco-V et al., 2007),

excepto para la fibra dietaria (20,5 ± 1,55 g/100 g b.s.), que fue superior a lo informado en varios estudios (4-9,7 g/100 g b.s.). Aún después de la molienda abrasiva (Fig. 5), si bien el contenido de fibra disminuyó, continuó siendo elevado (13,54-16,22 g/100 g b.s.) en relación con los valores previamente mencionados.

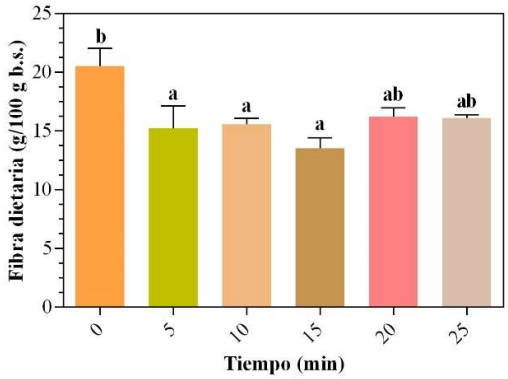


Figura 5. Contenido de fibra dietaria en granos de quinoa en función del tiempo de molienda abrasiva. Las barras corresponden a la media y las barras de error al DS. Valores con la misma letra no difieren significativamente (p<0,05)

El contenido de proteínas (Fig. 6) se vio principalmente afectado a partir de los 20 min de molienda, probablemente a causa de una reducción significativa de la masa de los granos (≥ 25%) que se asoció a la remoción de una fracción considerable de germen. La mayor parte de las proteínas del grano de quinoa se localizan en el embrión, que representa el 30% del peso total de la semilla. En el caso de cereales comunes, como el trigo, el germen representa sólo el 1% de la semilla (Repo-Carrasco-V *et al*., 2007).

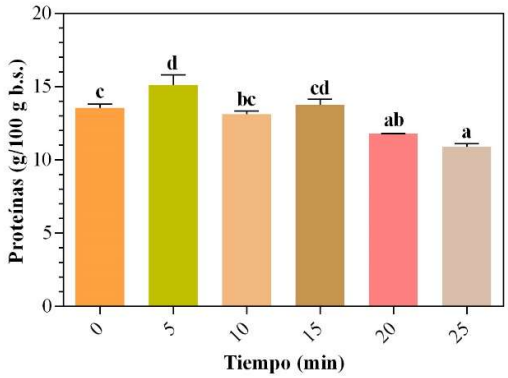


Figura 6. Contenido de proteínas en granos de quinoa en función del tiempo de molienda abrasiva. Las barras corresponden a la media y las barras de error al DS. Valores con la misma letra no difieren significativamente (p<0,05)

Por otro lado, al cabo de 5 min de molienda los granos tuvieron el mayor contenido de proteínas (15,12 ± 0,66 g/100 g b.s.), incluso superior al de las semillas sin tratar (13,56 ± 0,26 g/100 g b.s.), lo que se atribuye a la remoción del pericarpio, que disminuyó la cantidad de fibra dietaria (y de saponinas), pero no de proteínas.

La cantidad de cenizas es indicativa de los minerales presentes en los granos de quinoa (Repo-Carrasco-V *et al*., 2007). El contenido de cenizas de los granos sin tratar (0 min) fue de 3,38 ± 0,07 g/100 g b.s., lo que permite considerar a estas semillas una gran fuente de minerales, tales como Ca, Mg, K, P, Fe, Cu y Zn, superando el contenido mineral de cereales como el maíz, el arroz y la cebada (Mufari *et al*., 2018). El contenido de cenizas (Fig. 7) disminuyó con el tiempo de procesamiento llegando a 2,07 ± 0,03 g/100 g b.s. al cabo de 25 min, siendo más significativa esta disminución (30,4-39%) a partir de los 20 min de molienda abrasiva, probablemente debido a la mayor proporción de embrión desprendido, el cual es rico en minerales (D'Amico *et al*., 2019).

El contenido de materia grasa (Fig. 8) se mantuvo constante e igual al control entre 5-15 min (7,39-7,83 g/100 g b.s.) de molienda, no obstante, a partir de los 20 min de procesamiento la reducción fue prominente (25-32%), nuevamente debido a la mayor proporción de embrión desprendido, el cual es rico en materia grasa (D'Amico *et al*., 2019). Pese a esto, el contenido de materia grasa remanente en los granos perlados durante 25 min ascendió a 5,33 ± 0,38 g/100 g b.s., valor superior al del maíz (4,9 g/100 g b.s.), razón por la que se puede considerar como un grano con potencial para la extracción de aceite (Mufari *et al*., 2018).

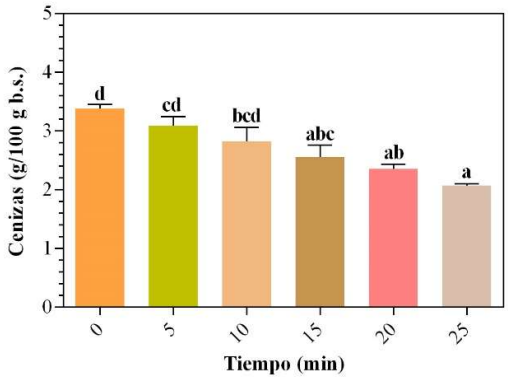


Figura 7. Contenido de cenizas en granos de quinoa en función del tiempo de molienda abrasiva. Las barras corresponden a la media y las barras de error al DS. Valores con la misma letra no difieren significativamente (p<0,05)

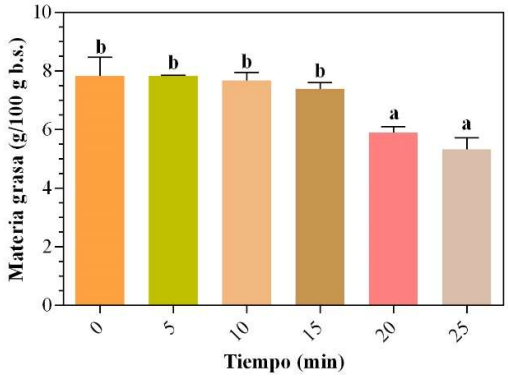


Figura 8. Contenido de materia grasa en granos de quinoa en función del tiempo de molienda abrasiva. Las barras corresponden a la media y las barras de error al DS. Valores con la misma letra no difieren significativamente (p<0,05)

Al igual que en los cereales, los carbohidratos son el componente principal de la quinoa. Sin embargo, la quinoa no pertenece a la misma familia botánica, por lo que se la denomina pseudocereal (Mufari *et al*., 2018). En este trabajo los carbohidratos (obtenidos por diferencia) variaron entre 54,72 ± 2,52 g/100 g b.s. (0 min) y 65,61 ± 0,87 g/100 g b.s. (25 min). Estos valores fueron inferiores a otros granos de consumo común, como el maíz, el arroz y la cebada, que tienen contenidos de carbohidratos de 71,2-80,2 g/100 g b.s. (Repo-Carrasco-V *et al*., 2007).

Los carbohidratos siguieron la tendencia opuesta (Fig. 9), incrementándose conforme avanzó la molienda hasta un 19,9% al cabo de 25 min, debido a la remoción de los otros constituyentes de grano (cenizas, materia grasa, fibra dietaria y proteínas).

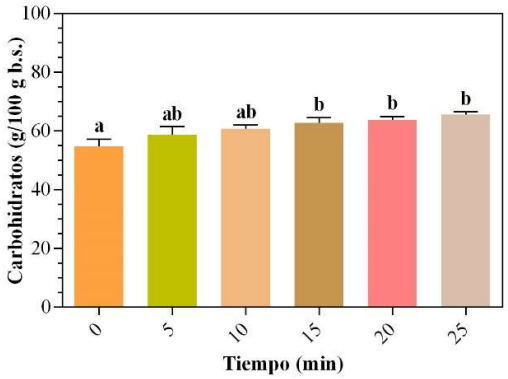


Figura 9. Contenido de carbohidratos en granos de quinoa en función del tiempo de molienda abrasiva. Las barras corresponden a la media y las barras de error al DS. Valores con la misma letra no difieren significativamente (p<0,05)

3.4. Análisis de correlación

Para evaluar la relación entre la composición centesimal y la variable del proceso (tiempo de molienda abrasiva) así como la relación de la composición con el rendimiento y el área proyectada, se realizó el análisis de correlación mediante la matriz de Pearson. Las correlaciones significativas encontradas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Correlaciones momento producto de Pearson, entre los componentes del grano y, el rendimiento de la molienda, el área proyectada de los granos y el tiempo de procesamiento.

Componente	Tiempo	Rendimiento	Área proyectada
Proteínas	r = -0,9397 p < 0,02	r = 0,931 p < 0,03	r = 0,9829 p < 0,01
Cenizas	r = -0,9972 p < 0,01	r = 0,9737 p < 0,01	r = 0,9572 p < 0,02
Materia grasa	r = -0,9553 p < 0,02	r = 0,986 p < 0,01	r = 0,9747 p < 0,01
Carbohidratos	r = 0,9979 p < 0,01	r = -0,9793 p < 0,01	r = -0,9661 p < 0,01

Estos resultados corroboran que existe una relación lineal entre el tiempo de molienda abrasiva, variable operativa, y el decremento de los constituyentes de los granos de quinoa (principalmente minerales, proteínas y materia grasa), producto de la remoción de las capas externas de la semilla y del embrión, asociado a una reducción de la masa y del tamaño de los granos. Asimismo, se visualiza un aumento proporcional en el contenido de carbohidratos, a razón del enriquecimiento de los granos en estos

por la diminución de los componentes secundarios.

4. Conclusiones

La molienda abrasiva ocasionó una pérdida de masa en los granos de quinoa de aproximadamente una cuarta parte, no obstante, el área proyectada se redujo hasta la mitad al cabo de 25 min de proceso.

A partir de los 5 min de tratamiento no se detectó espuma, lo que indica una baja concentración de saponinas, y una efectiva remoción de estas, empleando bajos tiempos operativos. Además, 5 min de molienda proporcionan el mayor contenido de proteínas, a raíz de la remoción del pericarpio, que disminuyó la cantidad de fibra dietaria pero no de proteínas.

El contenido de fibra dietaria de la variedad *Ayrampo* fue considerablemente mayor al reportado en bibliografía para otras variedades de quinoa. A su vez, presentó un elevado contenido de cenizas y de materia grasa, aún después de 25 min de molienda. Por otra parte, tanto el contenido de proteínas, como de minerales y de materia grasa se vio principalmente afectado a partir de los 20 min de abrasión, debido a la mayor remoción del embrión. Todos los componentes químicos del grano disminuyeron con el progreso de la molienda, lo cual se correlacionó con la pérdida de rendimiento y de tamaño de las semillas. Contrariamente, el contenido de carbohidratos se incrementó, producto de la merma de los demás constituyentes. En resumen, tiempos de proceso de 5-15 min proporcionan resultados óptimos.

Por lo tanto, la molienda abrasiva es un método sustentable y prometedor para obtener quinoa con calidad alimentaria mediante un enfoque "verde". Al mismo tiempo los subproductos, con alto valor biológico (capas externas del grano con saponinas) o nutricional (germen) podrían ser aprovechados no sólo por la industria alimentaria sino también por la farmacéutica o nutracéutica en pos de una economía circular.

5. Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires (Proyecto UBACYT 20020170100367BA), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PME-2006-01685, PICT-2018-01619) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina.

6. Referencias

AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Washington, EE.UU.

Koziol, M.J. (1991). *Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*, J SciFood Agric. 54, 211-219.

Loubes, M.A.; Tolaba, M.P. (2013). *Arroz: rendimiento de molienda mediante análisis de imágenes*, La Alimentación Latinoamericana 308, 44-49.

González Alemán (n.d.). *La Quinua: El Grano dorado de los Andes y su importancia socioeconómica en Bolivia.* Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Cultivos%20Andinos/Quinua/Bibliografia%20Quinua/3%20COMERCIALIZACION/PROMOCION%20del%20CULTIVO/Importancia%20Socio%20economica%20de%20la%20Quinua.pdf. Último acceso: 21 de octubre de 2021.

Repo-Carrasco-V, R.; Cortez, G.; Onofre Montes, R.; Quispe Villalpando, L. y Ramos, I. (2007). *Cultivos andinos*. In De tales harinas, tales panes by A.E. León, y C.M. Rosell, pp. 245-294. CYTED, Córdoba. Argentina.

De Dios Elizalde, A.; Porrilla, Y.P. y Chaparro, D.C. (2009). *Factores antinutricionales en semillas.* Facultad de Ciencias Agropecuarias, 7(1), 45-54.

Ahumada, A.; Ortega, A.; Chito, D. y Benítez, R. (2016). *Saponinas de quinua (Chenopodiumquinoa Willd.): un subproducto con alto potencial biológico*, Rev. Colomb. Cienc.Quím. Farm., 45(3), 438-469.

Gómez-Caravaca, A.M.; Iafelice, G.; Verardo, V.; Marconi, E. y Caboni, M.F. (2014). *Influence of pearling process on phenolic and saponin content in quinoa (Chenopodium quinoa Willd),* Food Chemistry, 157, 174-178.

D'Amico, S.; Jungkunz, S.; Balasz, G.; Foeste, M.; Jekle, M.; Tömösköszi, S. y Schoenlechner, R. (2019). *Abrasive milling of quinoa: Study on the distribution of selected nutrients and proteins within the quinoa seed kernel*, Journal of Cereal Science, 86, 132-138.

Gianna V. (2013). *Extracción, cuantificación y purificación de saponinas de semillas de Chenopodium quinoa Willd provenientes del Noroeste argentino*, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.

Tránsito López Luengo, M. (2001). *Saponósidos*, Offarm, 20(6), 124-129.

Bergesse, A.E.; Miranda-Villa, P.; Mufari, J.R.; Albrecht, C. y Cervilla, N.S. (2019). *Evaluación de las condiciones de desamargado en húmedo de quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*, Nutr. clín. diet. hosp., 39(1), 107-114.

Reichert, R.D.; Tatarynovich, J.T.; Tyler, R.T. (1986). *Abrasive dehulling of quinoa (Chemopodium quinoa): effect on saponin content was determined by an adapted hemolytic assay*, Cereal Chem., 63, 471-475.

Abugoch, L.E. (2009). *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): composition, chemistry, nutritional and functional properties*, Adv. Food Nutr. Res., 58, 1-31.

Mufari, J.; Miranda-Villa, P.; Bergesse, A.; Cervilla, N. Y Calandri, E. (2018). *Physico-chemical analysis and protein fraction compositions of different quinoa cultivars*, Acta Alimentaria, 47(4), 462-469.

38TCA - Efecto del glicerol en la formación de nanoemulsiones estabilizadas por saponina quillaja y Tween 80

Effect of glycerol on the formation of quillaja saponin and T80 stabilized nanoemulsions

Noelia A. Cittadini[1], Fernando A. Bellesi[1,2], Carolina Arzeni[1,2], Ana M. R. Pilosof[1,2]

1. ITAPROQ – Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, CABA.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.
E-mail: fernandobellesi@gmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo es estudiar el impacto del uso de glicerol (GLI) como co-solvente en la formación de nanoemulsiones estabilizadas con saponina quilllaja (SQ) y Tween 80 (T80), con el fin de reducir el uso de emulsionantes sintéticos, como T80. Para ello, se obtuvieron nanoemulsiones O/W (10/90) utilizando un homogeneizador de alta presión (1000 bar, 2 pasos) de acuerdo con un diseño experimental de Doehlert, variando: SQ (1-5%), T80 (0,5-3%) y GLI (5-35%). Las nanoemulsiones presentaron tamaños de gota promedio entre 125,8 y 190,9 nm y distribuciones de tamaño de gotas en su mayoría monomodales, medidos por dispersión dinámica de luz. T80 fue la variable más influyente en la reducción de tamaño de gota. La combinación óptima de emulsionantes y cosolvente resultó ser de 1,77% de SQ; 2,96% de T80 y 35% de GLI (sin co-solvente: 3,33% de SQ y 2,83% de T80). Por otro lado, la presencia de GLI no permitió una reducción adicional de T80, pero sí de SQ, en casi un 50%. Para concluir, si bien la incorporación de GLI no conduce a una reducción adicional de la concentración de T80, podría servir como una alternativa económicamente favorable al reemplazar parte de la SQ requerida.

Palabras clave: nanoemulsiones, saponina quillaja, glicerol, Tween 80

Abstract

The objective of this work is to study the impact of glycerol (GLI) as a co-solvent in the formation of nanoemulsions stabilized with quilllaja saponin (SQ) and Tween 80 (T80), in order to reduce the use of synthetic emulsifiers, like T80. For this purpose, O/W nanoemulsions (10/90) were obtained using a high-pressure homogenizer (1000 bar, 2 steps) according to a Doehlert experimental design, varying: SQ (1-5%), T80 (0, 5-3%) and GLI (5-35%). Nanoemulsions showed average droplet sizes between 125.8 and 190.9 nm, and mostly monomodal droplet size distributions, measured by dynamic light scattering. T80 was the most influential variable in droplet size reduction. The optimal combination of emulsifiers and cosolvent was 1.77% SQ; 2.96% T80 and 35% GLI (without co-solvent: 3,33% SQ and 2,83% T80). On the other hand, the presence of GLI did not cause an additional reduction of T80, but it reduced SQ concentration, by almost 50%. To conclude, although the incorporation of GLI does not lead to a further reduction in the concentration of T80, it could be useful as an economically favorable alternative as it partially replaces the required concentration of SQ.

Keywords: nanoemulsions, quilaja saponin, Tween 80

1. Introducción

Es sabido que para el correcto funcionamiento biológico y evitar reacciones adversas que afecten a la salud, es necesario mantener una relación apropiada ω-6:ω-3. Debido a la deficiencia poblacional en el consumo de ω-3, las autoridades sanitarias de muchos países promocionan el consumo de alimentos ricos en ω-3 con la intención de conseguir el balance adecuado. La incorporación de aceite de chía a los alimentos resulta un camino promisorio para la obtención de alimentos funcionales fuente de omega 3. Sin embargo, la incorporación de lípidos bioactivos en alimentos, cuyo principal componente es el agua, presenta varios desafíos tecnológicos que incluyen la manera de vehiculizarlos en la fase acuosa, la protección de estos a la oxidación, su protección durante el tránsito gastrointestinal y el aseguramiento de su liberación en el intestino delgado, donde finalmente serán absorbidos (bioaccesibilidad). Entre las alternativas que permiten la inclusión de lípidos en sistemas líquidos se encuentran el diseño de sistemas coloidales de liberación que incluyen las emulsiones. El Tween 80 (T80) es ampliamente utilizado en la formulación de nanoemulsiones O/W para aplicaciones cosméticas, farmacéuticas y alimentarias debido a sus excelentes propiedades interfaciales, facilidad de uso y costo. Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que posee, su origen sintético está siendo cuestionado debido a la tendencia actual de consumo que promueve y persigue productos de origen natural. La saponina quillaja (SQ) es un nuevo y prometedor tensioactivo natural que se obtiene por extracción acuosa o alcohólica de la corteza molida o madera entera de la Quillaja saponaria Molina, un árbol originario de Chile. El extracto de Quillaja contiene más de 100 saponinas (Kite et al., 2004). Las saponinas se caracterizan por sus moléculas relativamente pequeñas, formadas por una aglicona (hidrófoba) y una o más cadenas de azúcar (hidrófila), que le confieren su naturaleza anfifílica, proporcionándole así sus propiedades tensioactivas (Yang et al., 2013). En un trabajo previo, se estudió la factibilidad de reemplazar total o parcialmente el T80 por SQ y se determinó que la mezcla óptima para obtener nanoemulsiones con tamaño de gota equivalente al de una emulsión estabilizada con 5% de T80 fue de 3,33% de SQ y 2,83% de T80 (Cittadini et al., 2018). Por otro lado, glicerol (GLI) es un alcohol trivalente, soluble en agua y que permite modificar las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones, ya sea alterando las propiedades de los emulsionantes o aumentando la viscosidad de la fase continua, de manera que se evita la colisión entre las gotas (Chanasattru et al., 2009). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar el impacto del uso de glicerol (GLI) como co-solvente en la formación de nanoemulsiones estabilizadas con SQ y T80, con el fin de reducir el uso de emulsionantes sintéticos, como T80.

2. Materiales y métodos

El aceite de chía (*Salvia hispanica*) usado para la preparación de las emulsiones fue provisto por Nutracéutica Sturla S.R.L. (Argentina). El surfactante natural SQ (Naturex), con un contenido de saponinas mayor a 30%, fue proporcionado por Chile Botanics SA. Se utilizó T80 marca ALKEST® TW80 (OXITENO) provisto por Cicloquímica S.A.C. y glicerol de grado alimentario, provisto por Química Oeste S.A.

Se prepararon emulsiones de aceite en agua (O/W) homogeneizando 10% p/p de aceite de chía con 90% p/p de fase acuosa, compuesta por una mezcla de surfactantes (T80 y SQ), ácido ascórbico 0,05% (antioxidante), sorbato de potasio 0,05% p/p (conservante) y ácido cítrico y citrato de sodio (buffer pH 3). Las emulsiones se obtuvieron en dos etapas: preparando primero una emulsión (3 min en homogeneizador de alta velocidad, Ultraturrax T8 (Ika-Werke, GMBH & Co., Alemania) a 25000 rpm, con una unidad de dispersión S8 N-10G, luego 5 min en un procesador ultrasónico Vibra Cell, modelo VCX 750 (Sonics & Materials, Inc., Newton, CT, EE. UU.) con un microtip de 3 mm de diámetro a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud del 20%) y, en una segunda etapa, estas emulsiones se procesaron en un homogeneizador de alta presión de dos etapas Panda Plus 2000 (GEA Niro Soavi, Italia) operado a 1000 bar (primera etapa 150 bar). Las muestras se circularon por el homogeneizador dos veces para obtener la nanoemulsión final.

Para evaluar el impacto de la mezcla de emulsionantes y de cosolvente en la formación de las nanoemulsiones se utilizó un diseño basado en una red de Doehlert (Doehlert, 1970) de 3 factores. Los factores estudiados fueron las concentraciones de SQ, T80 y GLI, según lo indica la Tabla 1.

Tabla 1. Experiencias realizadas basadas en diseño de Doehlert

Formulación	SQ (%p/p)	T80 (%p/p)	GLI (% p/p)
G1	3	3	20
G2	3	0,5	20
G3	3	2,375	35
G4	3	1,125	5
G5	3	2,375	5
G6	3	1,125	35
G7	5	2,375	25
G8	1	1,125	15
G9	1	2,375	15
G10	1	1,75	30
G11	5	1,125	25
G12	5	1,75	10
G13	3	1,75	20
G14	3	1,75	20
G15	3	1,75	20

Los valores reales de las variables independientes (x) se codificaron en base a una relación lineal entre los valores codificados (z) y reales (x) de acuerdo con la Ecuación 1:

$$x = z.\frac{\Delta x}{\Delta z} + x_0 \qquad (1)$$

Donde:
x es el valor de la variable independiente
z es el valor codificado de la variable independiente (predeterminado en la matriz experimental)
x_0 es el valor real de la variable independiente en el centro del dominio
Δx y Δz son la diferencia entre el máximo y el mínimo valor real y codificado respectivamente.
Los factores y niveles se detallan a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Valores reales (x) y codificados (z) para las variables estudiadas

Variable	Símbolo	Valores de x y (z)
SQ (% p/p)	x_1	1% (-0,816) | 3% (0) | 5% (0,816)
T80 (% p/p)	x_2	0,5% (-1) | 1,125% (-0,5) | 1,75% (0) | 2,375% (0,5) | 3% (1)
GLI (% p/p)	x_3	5% (-0,866) | 10% (-0,577) | 15% (-0,289) | 20% (0) | 25% (0,289) | 30% (0,577) | 35% (0,866)

Se ajustó a un modelo cuadrático de la siguiente forma:

$$Y = b_0 + b_1.x_1 + b_2.x_2 + b_3.x_3 + b_4.x_1^2 + b_5.x_2^2 + b_6.x_3^2 + b_7.x_1.x_2 + b_8.x_1.x_3 + b_9.x_2.x_3 \qquad (2)$$

Donde:

Y es la respuesta
b_i son los coeficientes de regresión obtenidos a partir del modelo
x_1 es la concentración de SQ
x_2 es la concentración de T80
x_3 es la concentración de GLI

Se determinó el tamaño de gota promedio (Z-Av) y la distribución de tamaño de gotas en las emulsiones recién preparadas mediante dispersión dinámica de luz, en un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) provisto con un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital, modelo ZEN3600.

3. Resultados y Discusión

En un estudio previo, se comprobó que era posible obtener nanoemulsiones y minimizar la utilización de T80, utilizando SQ como co-emulsionante y distintos métodos de homogeneización (Cittadini et al., 2018). Sin embargo, a fin de evaluar una posible reducción adicional de las concentraciones de T80 necesarias, se decidió estudiar la incorporación de GLI como co-solvente en la fase acuosa de las formulaciones para medir su influencia en el tamaño de gota.

Estudios previos ya han reportado que la adición de cosolventes (como alcoholes y polioles) puede influir en gran medida en la formación y las propiedades de los sistemas basados en emulsiones (Coles & Thomas, 1952; Fanun, 2007; Garti et al., 2001; Magdassi & Frank, 1986, 1990; Sun et al., 2011; Yaghmur et al., 2002). El GLI es un cosolvente (soluble en agua) que modifica las propiedades fisicoquímicas de las soluciones acuosas, como la densidad, la viscosidad y el índice de refracción (Weast Astle & Beyer, 1983). La adición de GLI a soluciones acuosas también ha demostrado alterar la tensión interfacial y las características de solubilidad de tensioactivos tanto iónicos como no iónicos (Aramaki et al., 1999; D'Errico et al., 2005; Patel et al., 2010; Ruiz et al., 2008; Sansanwal, 2006).

La Tabla 3 muestra los valores de los diámetros promedio, Z-Av, para las nanoemulsiones, cuyos valores se encuentran entre 125,8 y 190,9 nm, es decir que todas las formulaciones presentaron un diámetro promedio inferior a 200 nm, con lo cual podemos afirmar que es posible obtener nanoemulsiones.

Tabla 3. Diámetro de gota promedio (Z-Av) de las nanoemulsiones G estabilizadas con diferentes

porcentajes de emulsionantes T80 y SQ, y diferentes porcentajes de co-solvente GLI

Nanoemulsión	Zav (nm)
G1	129,9
G2	190,9
G3	125,8
G4	150,9
G5	141,2
G6	158,8
G7	141,4
G8	158,7
G9	142,9
G10	143,4
G11	150,8
G12	144,2
G13	141,1
G14	139,5
G15	139,0

A modo de ejemplo, se muestra la distribución de tamaño de gotas de la formulación G10 (Figura 1). En todas las formulaciones, la distribución fue mayormente monomodal, con un pequeño hombro a tamaños mayores a 100 nm. Dicha homogeneidad en la distribución de gotas podría incidir de manera favorable en la estabilidad de las emulsiones formadas.

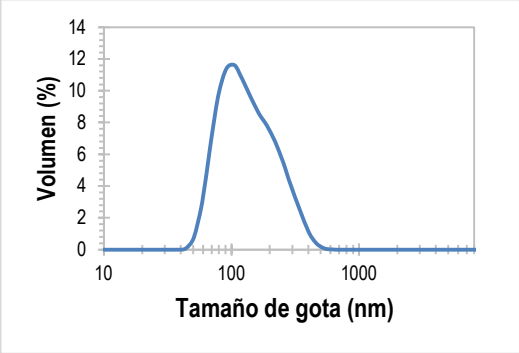


Figura 1. Distribución de tamaño de gotas en volumen de la formulación G10

Mediante el análisis estadístico se obtuvo el gráfico de malla de la superficie de respuesta (Figura 2) que evalúa la influencia conjunta de las tres variables (SQ, T80 y GLI) sobre el tamaño de partícula promedio (Z-Av). En el mismo es posible observar *a priori* que los menores tamaños de gota promedio se encuentran en la zona comprendida por altas concentraciones de GLI y altas concentraciones de T80, para todo el rango de concentraciones de SQ (zona azul del gráfico).

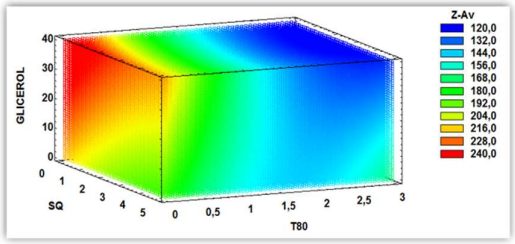


Figura 2. Gráfico de malla de la superficie de respuesta del tamaño de partícula promedio (Z-Av, en nm) en función de las concentraciones de emulsionantes (T80 y SQ) y de GLI, expresados en % p/p.

La ecuación de regresión asociada a la malla de la superficie de respuesta es la siguiente:

$$Z\text{-}Av = 216{,}97 - 10{,}86.SQ \mathbf{- 61{,}06.T80} + 1{,}17.GLI + 0{,}95.(SQ)^2 + 2{,}83.SQ.T80 - 0{,}03.SQ.GLI + \mathbf{13{,}14.(T80)^2} - 0{,}62.T80.GLI - 0{,}004.(GLI)^2 \quad (3)$$

La magnitud de R^2 asociada a dicha regresión tiene un valor igual a 0,9305 lo cual indica que el modelo, así ajustado, explica la respuesta observada en un 93,05% de los casos.

En la Tabla 4 se resumen los coeficientes de regresión de la Ecuación 3 y se resaltan los términos que resultan significativos ($p<0,05$), como lo demuestra el diagrama de Pareto (Figura 3).

Tabla 20. Coeficientes de regresión para Z-Av, los valores resaltados corresponden a los coeficientes significativos

Coeficiente	Valor Estimado
Constante	216,969
A: SQ	-10,8611
B: T80	-61,058
C: GLI	1,17025
AA	0,948611
AB	2,83333
AC	-0,0252778
BB	13,1413
BC	-0,621333
CC	-0,00366667

Como es bien sabido, el diagrama de Pareto (Figura 3) muestra las variables más influyentes de la Ecuación 3 en el tamaño de gota promedio

(Z-Av). En dicho diagrama los factores estadísticamente significativos son aquellos que sobrepasan la línea vertical, la cual representa el valor t de la distribución t-student con un intervalo de confianza del 95%.

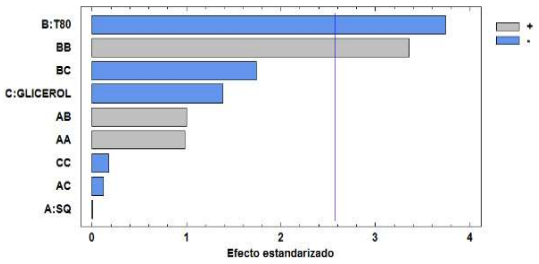


Figura 3. Diagrama de Pareto del efecto de las concentraciones de T80, SQ y GLI en el valor de Z-Av

En este caso los dos términos significativos de la Ecuación 3 corresponden, en primer lugar, al término lineal de T80 (B) y, en segundo lugar, al término cuadrático de T80 (BB). El factor de mayor peso fue el término lineal de T80 y el signo menos (-) en el diagrama de Pareto indica que este factor es inversamente proporcional a la variable de respuesta, es decir, que a mayor concentración de T80 se logra una mayor reducción del tamaño promedio de partícula (Z-Av). El siguiente término significativo es el término cuadrático de T80, que al ser positivo (+) indica la existencia de un mínimo en la respuesta, es decir, un posible mínimo en el tamaño de gota para ciertos valores de la variable analizada, con lo cual cabría esperar que la malla de la superficie de respuesta muestre esta tendencia (Figura 2).

Por último, mediante el análisis estadístico, se optimiza la respuesta para obtener la combinación de concentraciones óptimas de emulsionantes y cosolvente (Tabla 5) que producen un valor de Z-Av igual a 119,7 nm. Se eligió este valor ya que corresponde al valor de Z-Av de la emulsión estabilizada solo con T80 al 5%. En este caso, el análisis estadístico arrojó que el valor mínimo de Z-Av que es posible lograr con las formulaciones G es de 120,49 nm, y las concentraciones que optimizan esta respuesta son 1,77% de SQ; 2,96% de T80 y 35% de GLI.

Estos resultados indican que la incorporación de cosolvente a la formulación no permitió una reducción adicional de T80 con respecto a las formulaciones sin cosolvente (cuyos resultados arrojaron una combinación óptima de emulsionantes de 3,33% de SQ y 2,83% de T80), sin embargo se pudo lograr una reducción de casi 50% en la concentración de SQ y obtener el mismo tamaño de gota, lo cual puede estar indicando que la presencia de GLI en la emulsión provoca una mayor eficiencia en el efecto emulsionante de SQ y se requiera menor concentración para obtener el mismo efecto.

Es interesante destacar que, si bien la incorporación de GLI no conduce a una reducción adicional de la concentración de T80, podría servir como una alternativa económicamente favorable para lograr un tamaño de gota aceptable, ya que el reemplazo de una porción de SQ por GLI impactaría en el costo de la emulsión. Por otro lado, es importante considerar que las saponinas también presentan un límite máximo establecido, por lo tanto, una reducción parcial de su concentración conduciría a un mayor margen de trabajo en relación a los valores de ingesta establecidos.

La magnitud de R^2 asociada a la regresión (Ecuación 3), sugirió una capacidad predictiva muy satisfactoria. Con el objetivo de verificar dicha predicción, se procedió a realizar cuatro formulaciones (por duplicado) con distintas concentraciones de emulsionantes y cosolvente, para luego poder comparar los resultados experimentales con los predichos por el modelo. Como se muestra en la Tabla 6, las distintas experiencias confirman que el modelo presenta una satisfactoria capacidad de predicción.

Tabla 6. Comparación entre resultados experimentales y predicción del modelo para distintas formulaciones

Emulsión	SQ (% p/p)	T80 (% p/p)	GLI (% p/p)	Resultados experimentales: Zav promedio (nm)	Predicción del modelo: Zav predicho (nm)
D1	1	2	8	144,4 ± 10,0	142,2
D2	0,4	2	20	141,5 ± 19,5	142,4
D3	2	2	38	125,9 ± 12,0	130,9
D4	1	1,75	40	130,5 ± 14,0	141,8

4. Conclusiones

Los resultados indican que el agregado de GLI (hasta 35%) conduce a la formación de nanoemulsiones de tamaños similares a las nanoemulsiones sin GLI. A diferencia de lo esperado, el GLI permitió reducir la concentración de SQ en casi un 50% (pero no la de T80) y obtener el mismo tamaño de gota, siendo las concentraciones que optimizan el Z-Av: 2,96% de T80; 1,77% de SQ y 35% de GLI, lo que podría significar una ventaja económica por el menor uso de emulsionante.

5. Referencias

Aramaki, K., Olsson, U., Yamaguchi, Y., & Kunieda, H. (1999). Effect of water-soluble alcohols on surfactant aggregation in the C12EO8 system. *Langmuir*, *15*(19), 6226–6232. https://doi.org/10.1021/la9900573

Chanasattru, W., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Influence of glycerol and sorbitol on thermally induced droplet aggregation in oil-in-water emulsions stabilized by β-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, *23*(2), 253–261. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2008.02.004

Cittadini, N., Bellesi, F., Arzeni, C., & Pilosof, A. (2018). Saponina Quillaja como reemplazante de emulsionantes sintéticos en la obtención de nanoemulsiones. In L. Aballay, E. Veneciano, A. E. León, & V. E. Rosati (Eds.), *VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018)*. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba. https://cicytac.cba.gov.ar/wp-content/uploads/2018/12/Libro-de-Resúmenes-VII-CICYTAC-2018.pdf

Coles, C. L. J., & Thomas, D. F. W. (1952). The Stability of Vitamin a Alcohol in Aqueous and Oily Media. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *4*(1), 898–903. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1952.tb13223.x

D'Errico, G., Ciccarelli, D., & Ortona, O. (2005). Effect of glycerol on micelle formation by ionic and nonionic surfactants at 25°C. *Journal of Colloid and Interface Science*, *286*(2), 747–754. https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2005.01.030

Doehlert, D. H. (1970). Uniform Shell Designs. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, *19*(3), 231–239. https://doi.org/10.2307/2346327

Fanun, M. (2007). Propylene Glycol and Ethoxylated Surfactant Effects on the Phase Behavior of Water/Sucrose Stearate/Oil System. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *28*(8), 1244–1253. https://doi.org/10.1080/01932690701528159

Garti, N., Yaghmur, A., Leser, M. E., Clement, V., & Watzke, H. J. (2001). Improved Oil Solubilization in Oil/Water Food Grade Microemulsions in the Presence of Polyols and Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(5), 2552–2562. https://doi.org/10.1021/jf001390b

Kite, G., Howes, M., & Simmonds, M. (2004). Metabolomic analysis of saponins in crude extracts of Quillaja saponaria by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, *18*(23), 2859–2870. https://doi.org/10.1002/RCM.1698

Magdassi, S., & Frank, S. G. (1986). Formation of oil-in-glycerol/water emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *7*(5), 599–612. https://doi.org/10.1080/01932698608943481

Magdassi, S., & Frank, S. G. (1990). Formation of oil in glycerol/water emulsions: effect of surfactant ethylene oxide content. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *11*(5), 519–528. https://doi.org/10.1080/01932699008943275

Patel, H., Raval, G., Nazari, M., & Heerklotz, H. (2010). Effects of glycerol and urea on micellization, membrane partitioning and solubilization by a non-ionic surfactant. *Biophysical Chemistry*, *150*(1–3), 119–128. https://doi.org/10.1016/J.BPC.2010.03.015

Ruiz, C. C., Díaz-López, L., & Aguiar, J. (2008). Micellization of Sodium Dodecyl Sulfate in Glycerol Aqueous Mixtures. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/01932690701707571*, *29*(2), 266–273. https://doi.org/10.1080/01932690701707571

Sansanwal, P. (2006). Effect of co-solutes on the physico-chemical properties of surfactant solutions. *Journal of Scientific and Industrial Research*, *65*.

Sun, M., Si, L., Zhai, X., Fan, Z., Ma, Y., Zhang, R., & Yang, X. (2011). The influence of co-solvents on the stability and bioavailability of rapamycin formulated in self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *37*(8), 986–994. https://doi.org/10.3109/03639045.2011.553618

Weast Astle, M. J., & Beyer, W. H. (1983). *CRC Handbook of chemistry and physics.* CRC Press.

Yaghmur, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chain alcohols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *209*(1), 71–81. https://doi.org/10.1016/S0927-

7757(02)00168-1

Yang, Y., Leser, M. E., Sher, A. A., & McClements, D. J. (2013). Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*, *30*(2), 589–596. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2012.08.008

39TCA - Efecto del procesamiento térmico sobre las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de Goma Brea
Effect of thermal processing on Brea gum´s physicochemical and bioactive properties

Juan Pablo Quintero-Cerón[1], Juan Manuel Lázaro Martínez[2], María Laura Spotti [1], Carolina Acosta [1], María Julia Spotti [1], Laura Frison[3], Carlos Carrara[1].

1. Instituto de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, 1° Mayo 3250, Santa Fe, Argentina. 2. Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco – CONICET, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, CABA. 3. Departamento de Tecnología de Alimentos y Biotecnología – Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina.

Resumen

El efecto del procesamiento térmico sobre algunas propiedades fisicoquímicas de la goma brea (GB) (tamaño y distribución de partícula, potencial ζ, pH, turbiedad, productos de reacción de Maillard, color) así como bioactivas (contenido fenólico total, actividad antirradicalaria y actividad antifúngica *in vitro)* fueron evaluados. Los tratamientos térmicos en solución (100°C, 15min y 121 °C, 15 min, 1.1 atm) causaron un incremento del tamaño de partícula y por ende en la turbiedad de las muestras evaluadas. Contrariamente el calor seco (110°C, 24h) permitió la obtención de partículas nanocoloidales (~ 195,9 nm), un alto contenido fenólico y productos derivados de la reacción de Maillard, que contribuyeron con una fuerte actividad antioxidante así como modificaciones en los parámetros de color (diferencia total de color, índice de color). Ninguno de los fitopatógenos evaluados (*Penicillium glabrum, Aspergillus niger, Penicillium auranteogriseum y Alternaria tenuissima*) mostro susceptibilidad frente a la GB tratada térmicamente o no.

Palabras clave: hidrocoloide, nanocoloide, actividad antioxidante, melanoidinas

Abstract

The effect of thermal processing on some brea gum´s (GB) physicochemical properties (particle size distribution, z-potential, pH, turbidity, Maillard reaction products, color) and bioactivity (total phenolic content, *in-vitro* antiradical and antifungal activity) was evaluated. Thermal treatments applied to brea gum in solution (100°C, 15 min and 121 °C, 15 min, 1.1 atm) brought about increased particle sizes therefore higher turbidity of samples. Oppositely, dry heat (110 °C, 24 h) enabled nano colloids particles obtention (~ 195,9 nm), as well as higher phenolic content and Maillard reaction products which contributed to a strong antiradical activity and shift in color parameters. None of the evaluated phytopathogens (*Penicillium glabrum, Aspergillus niger, Penicillium auranteogriseum and Alternaria tenuissima*) showed susceptibility to GB, whether or not heat-treated.

Keywords: Hydrocolloid, nanocolloid, antioxidant activity, melanoidins

1. Introducción

La goma brea (GB) es un exudado vascular hidrosoluble de color amarillo-dorado pálido, secretado a través de heridas en la corteza del chañar, brea o palo verde (*Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pav. ex Hook.) *Cercidium praecox* (Ruiz & Pav. ex Hook.), una especie no maderera geográficamente distribuida en el Noroeste de Argentina (Jujuy, Salta, Catamarca, Tucumán, La Rioja y Santiago del Estero) y otras regiones forestales tales como Mendoza, Neuquén, Rionegro, Santa Fe, San Juan, San Luis. La producción y comercialización de esta goma vegetal liofilizada se promueve como un eje dinamizador de las economías regionales del noroeste argentino (Alesso et al., 2003). Desde el 2013, integra la lista positiva de aditivos del código alimentario argentino (Capítulo XVIII, art. 1398, inciso N. 72.1) al no ejercer efectos toxicológicos (von Müller et al., 2009), así como poseer propiedades estabilizantes espesantes y emulsionantes, que equiparan las de goma arábiga en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas (Castel et al., 2018). Estudios recientes expanden sus aplicaciones al diseño de alimentos libres de gluten (López et al., 2013; López & Jiménez, 2016), películas comestibles (PC) (Cecchini et al., 2017; Slavutsky et al., 2018; Spotti et al., 2016) e hidrogeles para liberación controlada (Slavutsky y Bertuzzi, 2019). Estas propiedades responden a una fracción mayoritariamente polisacárido (84%), compuesta por una cadena central de β-xilosa unida por enlaces 1-4 y altamente sustituida en C2 por mono, di y posiblemente trisacáridos (Sznaider et al., 2020). También se ha reportado un complejo polisacárido-proteína (16%) así como una fracción de naturaleza proteica (Castel et al., 2016) que explican sus propiedades interfaciales y emulsionantes. Su comportamiento reológico en dispersiones al 5.0% p/v, se corresponde a un fluido pseudoplástico con capacidad de formar geles débiles pero con una capacidad espesante superior a la goma arábiga e inferior a la goma xantan. La aplicación de tratamientos térmicos con calor seco (24 h, 110 °C) mejoraron las propiedades emulsionantes/estabilizantes de GB con una consecuente formación de productos de reacción de Maillard y modificaciones en el color (Castel et al., 2018). En la actualidad es escasa la información respecto a cambios en sus propiedades fisicoquímicas y bioactivas tras el procesamiento térmico con calor húmedo y seco, que potencialmente serían necesarios en eventuales incorporaciones como aditivo alimentario, o durante su procesamiento y manufactura, para lograr la inocuidad de la GB tras su recolección en campo. En este sentido, la presente investigación tuvo por objeto evaluar el efecto de diferentes tratamientos térmicos (calor húmedo, calor seco) sobre algunas propiedades fisicoquímicas (productos de reacción de Maillard, color, tamaño, distribución de partículas, turbiedad) y bioactivas (contenido fenólico total, capacidad antirradicalaria, antifúngica) de la GB.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

GB en crudo (nódulos) fue colectada en la provincia de Salta (República Argentina) y donada por el Proyecto Promoción de la Brea como Producto forestal no maderero para el desarrollo sostenible de las comunidades Wichí y Criollas del Chaco Salteño. Reactivo de Folin-Coicalteau fue adquirido a Biopack (Argentina). El ABTS, 2,2´azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) en forma de sal diamónica y el persulfato potásico $K_2S_2O_8$ (ultrapuro) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Alemania). Fungicida Cantus® (boscalid, 2-cloro-N-(4 clorobifenil-2-il)-nicotinamida)) fue donado por BASF Argentina S.A. Todos los patrones y reactivos químicos usados en el presente estudio fueron de grado analítico.

2.2 Purificación de la goma brea (GB)

La GB se purificó, mediante hidratación de los nódulos (150 $g.Kg^{-1}$) en agua destilada por 48 h a 4°C. Posteriormente, la mezcla fue homogenizada a 250 RPM en un agitador vertical de hélice durante 2 h, la suspensión obtenida fue filtrada para extraer restos de material vegetal así como material insoluble. Posteriormente, fue centrifugada a 3500 RPM, 30 min (Centrifuga BOECO U320, Alemania), el sobrenadante obtenido se filtró primero a través de papel filtro Whatman No.1 (retención de partículas > 11 μm) y seguidamente por uno de 0.45 μm. La solución obtenida fue congelada a -20 °C, liofilizada (Liofilizador Flexy- DryTM MP, FTS SYSTEMSTM, Stone Ridge, Nueva York, EEUU) y molida hasta la obtención de un polvo (Castel et al., 2016).

2.3 Tratamientos térmicos

Se realizaron tres diferentes tratamientos térmicos a la GB, 2 de ellos con calor húmedo. Se prepararon dispersiones de 100 ml al 15% p/p con GB purificada-liofilizada en frascos autoclavables y se dejaron hidratar durante 16 horas para lograr la completa disolución del hidrocoloide. Luego, para el tratamiento 1 (T1, vapor fluente), las soluciones de GB fueron sometidas a vapor de agua en autoclave a presión atmosférica (espita abierta, 100 °C) durante 15 min. En el tratamiento 2 (T2), la GB fue sometida a esterilización (vapor a presión) en autoclave (121 °C, 1.1 atm, 15 min).

El tratamiento 3 se basó en la aplicación de calor seco de acuerdo a lo descrito por Castel et al., (2018), con algunas modificaciones: aproximadamente 10 g de GB liofilizada fueron ubicados en cajas de Petri de vidrio y sometidas a 110 °C durante 24 horas. La GB sin tratar fue denominada GB Control. Las soluciones tratadas térmicamente con calor húmedo fueron congeladas a – 20°C, liofilizadas y finamente molidas hasta la obtención de un polvo. Las muestras se almacenaron en desecador hasta su posterior uso.

2.4 Tamaño de partícula, Potencial zeta (ζ) y pH

Mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y haciendo uso de un determinador de tamaño Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) se determinó el efecto de los tratamientos sobre el radio hidrodinámico de las partículas. Para este fin, 16 horas previas a las mediciones, se prepararon dispersiones de GB (GB Control, T1, T2, T3) al 0.5 % p/p. A estas mismas dispersiones se determinó pH (Potenciómetro PR-15, Sartorius Lab Instruments, GmbH & Co, Alemania) y potencial Z (Zetasizer Nano ZS90).

2.5 Turbiedad (estabilidad térmica de soluciones de GB)

Soluciones de GB Control, T1, T2 y T3 fueron preparadas al 5% p/p (16 h de hidratación) en agua desmineralizada y se midió la densidad óptica (absorbancia) en un espectrofotómetro Lambda-20, Perkín-Elmer (USA) a una longitud de onda de 600 nm (Zhong y Xiong, 2020). Los valores fueron expresados como turbiedad.

2.6 Análisis espectrofotométricos: Productos de reacción de Maillard

La densidad óptica de la GB en solución (0.5% p/p de GB Control, T1, T2, T3) medida a diferentes longitudes de onda, permitió caracterizar: productos tempranos (inestables-reversibles) de la reacción de Maillard (bases de Shiff), así como compuestos intermedios (más estables y potencialmente reversibles, productos de Amadori) mediante absorbancia a λ = 284 nm y λ = 304 nm (espectrofotómetro Lambda-20, Perkín-Elmer, USA). Adicionalmente, se midió la absorbancia λ=420 nm y así, estimar productos finales de glicación (melanoidinas). Estos últimos, son compuestos de alto peso molecular formados en estados avanzados de reacción de Maillard (Chawla et al., 2009; Loyeau et al., 2018; Wang et al., 2011).

2.1 Color

La valoración objetiva del color se llevó a cabo mediante registro de las coordenadas L*a*b* en un colorímetro Minolta CM508-d (Tokyo, Japón) equipado con iluminante D65, ángulo de observación de 10° y componente especular excluido (SCE). Previo a las medidas, el equipo se calibro con un estándar blanco. La diferencia total de color (ΔE^*_{ab}) fue calculada como sigue:

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad (1)$$

Donde ΔL*, Δa* y Δb* se refieren a la diferencia de luminosidad, eje cromático a*(plano rojo-verde), y componente b (amarillo-azul) entre la muestra tratada térmicamente y la GB Control. Por su parte el índice de color fue calculado así:

$$CI^* = \left(\frac{a^* * 1000}{L^* * b^*}\right) \quad (2)$$

CI*: los valores se analizaran de acuerdo a Tabla 1.

Tabla 1. Índice de color (CI*)

CI*	Color de la muestra
-40 a -20	Azul-violeta al verde profundo.
-20 a -2	Verde profundo al verde amarillento.
-2 a +2	Amarillo verdoso.
+2 a +20	Amarillo pálido al naranja intenso.
+20 a +40	Naranja intenso al rojo profundo.

2.7 Determinación espectrofotométrica del contenido fenólico total (CFT)

Dispersiones de GB control y tratadas térmicamente, fueron preparadas (1% p/p) en agua desmineralizada 16 h previas a la determinación de su CFT. Para esto, a 100 µL de cada muestra se le agregaron 1900 µL de agua destilada, seguidamente, fueron oxidadas mediante la adición de 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteau. Transcurridos 2 min, 800 µL de carbonato de sodio (5% p/v) fue incorporado y se homogenizo mediante vortex. Esta solución fue sometida a baño termostático (40°C) por 20 min, y luego a un baño de hielo para detener la reacción. La tonalidad azul generada fue medida a 754 nm en un espectrofotómetro Lambda-20, Perkín-Elmer, USA. Se realizó una curva de calibrado a partir de ácido gálico (AG), el patrón de referencia se diluyo hasta la obtención de concentraciones entre 50 – 300 ppm AG. El CFT fue expresado como mg Eq AG/100 g de GB (Escriche y Juan-Borrás, 2018).

2.8 Actividad antirradicalaria: Capacidad estabilizante del radical ABTS$^{\bullet+}$

La capacidad de los compuestos (lipofílicos, hidrofílicos) contenidos en la GB tratada térmicamente o no para estabilizar el monocatión radical ABTS$^{\bullet+}$, fue medida espectrofotométricamente (Lambda-20, Perkín-Elmer, USA) mediante la decoloración del radical preformado. El cromóforo verde/azul (ABTS$^{\bullet+}$), se formó tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) en agua desmineralizada tipo 1 y se conservó en la oscuridad durante 16 h previas a su uso. Tras la formación del radical ABTS$^{\bullet+}$, este fue diluido con etanol (96% v/v), hasta obtener una absorbancia de 0,700 ± 0,100 a 754 nm (Re et al., 1999). Se prepararon soluciones de cada muestra de GB al 1% p/v. Seguidamente, 40 µL de cada solución fueron agregados a 1960 µL de radical y se agitó inmediatamente. Transcurridos 1 y 6 min de reacción, se midió Abs_{754nm} a 25°C (Kuskoski et al., 2004). Como antioxidante de referencia se utilizó ácido ascórbico (AA) en concentraciones de 0 – 175 ppm. A partir de esta curva de calibrado, se expresó la capacidad antirradicalaria como mgAA/100 g GB o actividad equivalente a vitamina C (VCEAC), valor de referencia a partir del cual se compararon las muestras objeto de estudio.

2.9 Actividad antifúngica *in-vitro*: modelo de difusión en agar con pozo

Se valoró la actividad antifúngica *in vitro* de las diferentes GB en solución al 10% p/p mediante el modelo de difusión en agar con algunas modificaciones (Daoud et al., 2019; Finos et al., 2021; Ulagesan & Kim, 2018). Para este fin, reconocidos fitopatógenos y contaminantes de ambientes fueron previamente aislados, identificados y seleccionados como modelos (Pitt y Hocking, 2009), estos fueron: *Penicillium glabrum, Aspergillus niger, Penicillium auranteogriseum y Alternaria tenuissima.* Los fitopatógenos mencionados se sembraron en placas con MEA estéril (Agar extracto de Malta) e incubaron a 25°C (5 días). Luego, en condiciones de esterilidad se transfirieron las esporas fúngicas por raspado de las colonias formadas con ansa de ojal, a un tubo que contenía Tween 20 (0,1% p/v), hasta alcanzar una concentración de 10^6 esporas/mL (verificado mediante conteo en cámara de Neubauer). Se agregó1 mL del inóculo a un frasco autoclavable estéril que contenía 20 mL de MEA estéril, fue homogenizado y colocado en una caja de Petri (90 mm). Una vez que el medio se solidificó se realizaron 5 orificios equidistantes por placa, con un cilindro estéril de vidrio (8 mm de diámetro); en cada uno se de estos se agregaron 65 µL de GB (GB control, T1, T2, T3) en solución al 10% (p/p) y se incluyó en un quinto pozo un volumen similar del fungicida Cantus® al 0.2% p/v como control positivo, (BASF, gránulos dispersables) cuyo ingrediente activo es Boscalid (50 %). Luego, las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Los halos de inhibición fueron medidos con calibrador en triplicado. Se consideró un efecto antifúngico significativo, cuando el halo promedio fue ≥ 10 mm, sin considerar el diámetro del orificio.

Análisis de datos

Todas las variables fueron determinadas mínimo en triplicado. Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de rango de Tukey (HSD Tukey) a un nivel de confianza del 95% fueron aplicados usando el software Statgraphics Centurion XV.

3. Resultados y Discusión

3.1 Tamaño de partícula, Potencial zeta (ζ) y pH

Estructuralmente, la GB es un exudado compuesto mayoritariamente por tres fracciones, una netamente polisacárido (aprox 84%), una segunda (16% aprox) conformada por un complejo proteína-polisacárido y una tercera de naturaleza proteica y de diferentes pesos moleculares; estas tres fracciones son responsables de la funcionalidad como espumante y estabilizante de emulsiones (Castel et al., 2016). Recientemente, mediante RMN (resonancia magnética nuclear) fueron dilucidadas las estructuras que componen el porcentaje mayoritario de polisacáridos presentes en la goma. Este conjunto de arabino-glucuronoxilanos incluyen xilosa, arabinosa, ácido glucurónico y 4-O-metil glucurónico. La cadena central consiste en (1→4)-β-D-xilopiranosa sustituida en un 70% en su C2 por monosacáridos, disacáridos y posiblemente trisacáridos (Sznaider et al., 2020). Su aplicación en la industria alimentaria es diversa pero está supeditada a posibles cambios en la estructura de sus componentes tras el procesado térmico. Entendiéndose lo anteriormente expuesto, muestras de GB sin o con tratamiento térmico (calor húmedo o seco), fueron caracterizadas en términos de distribución de tamaño de partícula en intensidad (PSDi) (Figura 1) y en número (PSDn) (Figura 2), así como potencial zeta y pH (Tabla 2).

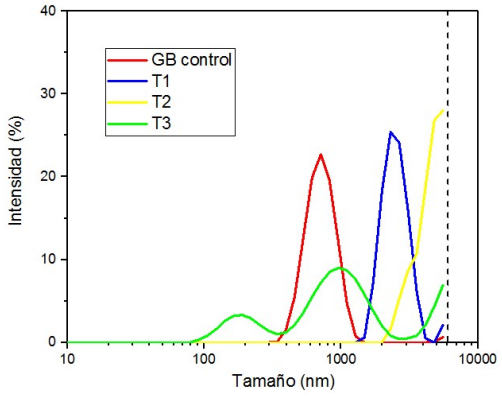


Figura 1. Distribución del tamaño de partícula en intensidad (PSDi) expresado en porcentaje (%) en función del diámetro hidrodinámico (dH) (nm)

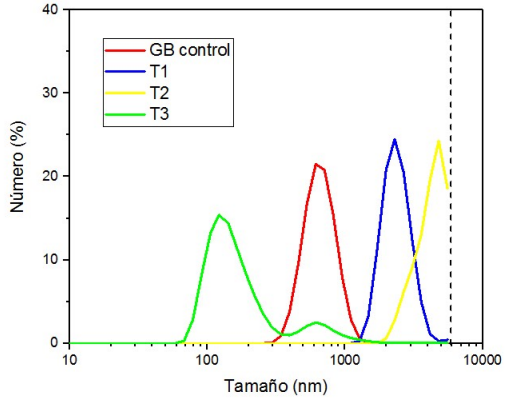


Figura 2. Distribución del tamaño de partícula en número (PSDn) expresado en porcentaje (%) en función del diámetro hidrodinámico (dH) (nm)

Como se observa en la Figura 1, la distribución de tamaño de partículas (PSDi) en intensidad en función de la intensidad relativa de luz dispersada de las muestras es dependiente del tratamiento térmico evaluado. La GB control, T1 y T2 mostraron un pico principal, se podría decir que son monomodales o menos dispersas, pero sus tamaños de partícula se incrementaron conforme aumentó la severidad del tratamiento térmico. Por ejemplo, la GB control presentó partículas del polímero (99,3% del área) con un diámetro hidrodinámico (dH) de 724,9 nm. Cuando se aplicó vapor fluente (T1) a 100°C y presión atmosférica, el dH de las partículas (97,9% área bajo la curva PSDi) alcanzó un valor de 2502 nm y se detectó una pequeña población (2.1% de porcentaje de intensidad) con un dH de 5560 nm. Cuando el tratamiento térmico se realizó a presión, es decir, bajo condiciones de esterilización, el dH presentó un único pico (100% de la intensidad del PSDi para T2) con un valor promedio de 4456 nm. La aplicación de calor seco en T3 (110°C, 24 h) y la posterior solubilización de la GB, mostro una distribución multimodal con tres picos bien definidos con 66,4%, 18,8% y 14,8% del área bajo la curva de intensidad, y que se corresponden a tamaños promedio de 1031 nm, 195,9 nm, y 4881 nm, respectivamente. Si bien, se detectó un pico con partículas con dH superiores a T2, estas solo contribuyeron con el 14,8% de la intensidad generada por estas. Según el PSDi, el 18.8% presentaron valores menores a los 200 nm, partículas que no fueron observadas en la GB control, cuyo dH promedio fue 724,9 nm.

DLS permite obtener un PSDi y a partir de las propiedades ópticas del analito (índice de refracción de la GB, $Abs_{632\ nm}$) y usando la teoría de Mie, permite cuantificar una distribución del tamaño de partícula en número. En este sentido la Figura 2, presenta el efecto del procesado térmico sobre la PSDn de GB tratada térmicamente. Los valores de dH promedio mostraron un comportamiento monomodal para la GB Control, T1 y T2. El dH del número de partículas detectadas fue incrementándose conforme aumento la severidad del tratamiento térmico. El 100% de las partículas en GB control presento en promedio un dH=672,7 nm, el 99,1% de las partículas en T1 un dH = 2406 nm y T2 un dH= 4380 nm (100% número de partículas detectadas). Por su parte T3, presento un PSDn con comportamiento multimodal con tamaños de partículas que se corresponden con los observados en el PSDi, 13% de las partículas presentaron un dH de 718 nm, el 86,9% un dH de 151,7 nm y tan solo el 0,1% se corresponde a partículas de gran tamaño dH = 4824 nm.

Estas modificaciones en el tamaño y distribución de las partículas coloidales son el resultado de cambios conformacionales, así como interacción entre sus constituyentes (proteínas y polisacáridos). Estos cambios son dependientes de la naturaleza y conformación del polímero, temperatura, tiempo del tratamiento, pH y actividad de agua (Castel et al., 2018). Un ejemplo de ello, es la esterilización, que inevitablemente causa cambios químicos y físicos que impactan negativamente las propiedades organolépticas de ciertos productos (Nunes & Tavares, 2019). Resultados similares a los encontrados aquí fueron reportados por Zhong y Xiong, (2020). Ellos observaron un incremento en el tamaño de partículas de proteínas de frijol mungo en solución, sometidas a tratamientos térmicos suaves, desde dH=818 nm para el sistema control, a 876 y 1796 nm tras incrementar la temperatura a 50 y 70 °C durante 30 min, respectivamente.

Por otra parte, el tratamiento con calor seco (T3) de GB, mostró una disminución en el tamaño de las partículas con respecto al control cuando se analizó la distribución en número (151,7 nm,

PSDn 86.9%). Un comportamiento similar se observó en proteína de clara de huevo en polvo y sometida a 75 °C durante 0, 5, 10,15 y 20 días (Chang et al., 2020). El estado de agregación de las proteínas está directamente relacionado al balance entre las repulsiones electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas entre ellas. El incremento en la hidrofobicidad puede promover la agregación mientras que, las fuertes repulsiones electrostáticas pueden inducir la despolimerización (Weijers et al., 2002).

Tabla 2. Potencial ζ y pH de GB tratadas térmicamente

Muestra	Potencial ζ (mV)	pH
GB Control	-19,16 ± 0,72^{b}	3,88 ± 0,20^{ab}
T1	-20,40 ± 0,73^{b}	4,07 ± 0,10^{b}
T2	-19,20 ± 0,52^{b}	3,80 ± 0,04^{ab}
T3	-15,52 ± 1,33^{a}	3,77 ± 0,04^{a}

***Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (HSD Tukey).**

El potencial ζ es una medida de la carga neta superficial de las partículas y se determina por movilidad electroforética. Este potencial está influenciado por el pH al cual se mide. Como se observa en la Tabla 2, a pesar del tratamiento térmico aplicado, la carga neta superficial para los sistemas evaluados fue negativa, explicada en parte por la presencia de ácidos urónicos que se encuentran unidos a los C2 de las unidades de xilosa que componen la cadena principal del polisacárido (Sznaider et al., 2020). Si bien la electrostática superficial fue negativa en todas las muestras, esta fue significativamente menor en T3 ($p<0.05$), que puede ser debido al bajo pH. La GB presenta una carga positiva a valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico (pI: aprox 3.6) (Razavi, 2019), esta cercanía al pI de la GB en T3 podría explicar en parte, el descenso observado en su carga neta respecto a los tratamientos restantes (GB Control, T1, T2).

3.2 Turbiedad

La densidad óptica (Abs_{600}) de las soluciones (5% p/p) de GB, fue la técnica establecida para cuantificar la turbiedad en función del procesado térmico. De acuerdo a la Figura 3, el procesamiento térmico generó modificaciones significativas en el parámetro evaluado ($p<0.05$).
Todas las muestras analizadas fueron estadísticamente diferentes ($p<0.05$), GB control presento el menor valor de turbiedad (0,208 ± 0,21 U.A.), seguida en orden creciente por T3 (calor seco) 0,614 ± 0,001 U.A., T1 (2,011 ± 0,02 U.A.) y por ultimo T2 (2,34 ± 0,001 U.A.).

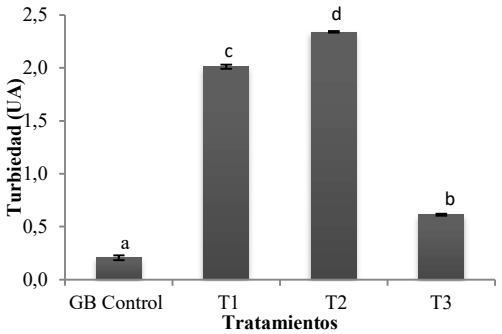


Figura 3. Cambio en la turbiedad de GB tratadas térmicamente.

Un bajo valor de turbiedad como el observado en GB control y T3, sugiere una menor dispersión de la luz como resultado de la presencia de pequeñas partículas (Zhong y Xiong, 2020), hecho que se corrobora con los tamaños y distribución de partículas en intensidad (PSDi) y número (PSDn) cuantificadas previamente por dispersión de luz dinámica.
En términos generales, el procesado térmico de la GB en solución (T1, T2) con vapor fluente y a presión, inducen un posible desdoblamiento de las proteínas constitutivas de la GB, exponiéndose las regiones hidrofóbicas; esta desnaturalización es seguida por la agregación de partículas. El tipo de agregados dependerá del pH, fuerza iónica y concentración de proteína. Cuando se está cerca al pI, las fuerzas repulsivas electrostáticas son débiles y las fuerzas atractivas intermoleculares, usualmente interacciones hidrofóbicas, inducen la formación de agregados de conformación aleatoria (Weijers et al., 2002). Estos agregados serían los responsables de la mayor turbidez en estos sistemas.

3.3 Análisis espectrofotométricos: Productos de reacción de Maillard

La reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático, se refieren a un conjunto de reacciones en las cuales están involucrados el grupo carbonilo de un azúcar reductor y un grupo amino disponible (en aminoácidos, péptidos o proteínas). Evidencia extensa, indica que la conjugación de proteínas y polisacáridos a través de la reacción de Maillard (MR), que ocurre de manera natural y espontánea durante el procesado térmico, potencialmente mejora las propiedades emulsionantes, solubilidad, antibacteriales y antioxidantes de las proteínas (Chawla et al., 2009; Chen et al., 2019).
Determinando la absorción a diferentes longitudes de onda, se puede realizar un seguimiento de ciertos productos de la reacción de Maillard (MRP´s) como ser: formación de bases de Shiff a 284 nm, compuestos de Amadori a 304 nm y compuestos tardíos (melanoidinas) a 420 nm

(Loyeau et al., 2018). En la Figura 4, se condensa los cambios en los MRP´s en GB con o sin tratamiento térmico.

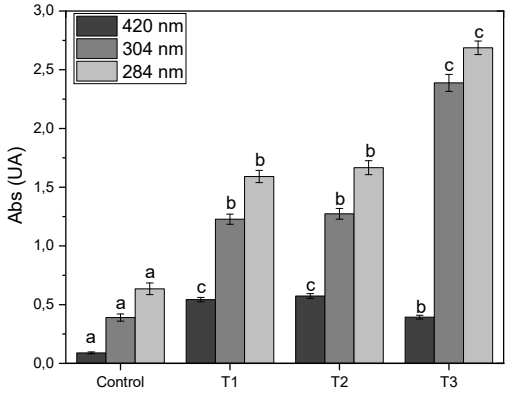


Figura 4. Productos de la reacción de Maillard en GB tratada térmicamente. Absorbancia de bases de Shiff (284 nm), compuestos de Amadori (304) y compuestos tardíos (420 nm).

Como se observa en la figura 4, hay un incremento en la absorbancia a las longitudes de onda del espectro UV evaluadas, indicando la presencia (GB control), así como formación de MRP´s (T1, T2, T3) en las muestras estudiadas. El aumento en la densidad óptica entre la GB control y los tratamientos en solución con vapor fluente y vapor a presión fue significativo ($p<0.05$), acentuándose en el tratamiento con calor seco ($p<0.05$). Las absorbancias a 284 nm y 304 nm fueron superiores a las medidas a 420 nm, indicando que bases de Shiff y productos de Amadori son dominantes en los conjugados formados entre las proteínas y polisacáridos presentes en la GB. Comportamiento que es análogo al observado en la formación de conjugados entre proteína de arveja y goma arábiga bajo condiciones controladas (70% HR, 60°C) (Zha et al., 2019).

Un comportamiento similar en el contenido de MRP´s en GB sin tratamiento y tratadas térmicamente con calor seco (110°C, 24 h), fue reportado por (Castel et al., 2018). Es interesante observar que a pesar de someter la muestra T3 a 110°C por 24 horas, la densidad óptica a 420 nm fue significativamente inferior ($p<0.05$) a los tratamientos con vapor fluente y a presión (esterilización). Un comportamiento similar se observó durante la formación de conjugados de goma acacia y proteína aislada de suero en solución, cuando se aplicó ultrasonido y tratamiento térmico simultáneamente. Presumiblemente, algunos tratamientos o fuerza mecánica aplicada al sistema, reducen o interfieren en la formación de productos tardíos de reacción de Maillard (Chen et al., 2019). Si bien, T3 no fue sometida a una operación de agitación, cavitación etc., durante el tratamiento térmico, su bajo contenido de humedad probablemente redujo la movilidad de las proteínas y por consiguiente su desdoblamiento y reacciones con moléculas adyacentes (Setiowati et al., 2020).

Podría concluirse, que los tratamientos térmicos con vapor fluente, vapor a presión en solución y calor seco a baja humedad, favorecen la formación de productos primarios e intermedios de Maillard. Sin embargo, cuando existe una baja movilidad molecular como el caso de T3, productos de mayor tamaño molecular que resultan de la polimerización (melanoidinas) se ven reducidos.

3.4 Color

Los cambios en el color de la GB tratada térmicamente pueden ser medidos de manera objetiva mediante técnicas instrumentales. Las coordenadas L* a* b* en el espacio de color CIELAB han sido previamente utilizadas para describir dichas modificaciones correlacionándolas con la formación de conjugados proteínas-polisacáridos (Castel et al., 2018; Zha et al., 2019). En la Tabla N.3, se listan los valores de luminosidad (L*), coordenadas cromáticas a* (verde-rojo) y b* (amarillo-azul) de las muestras de GB evaluadas.

Tabla 3. Coordenadas de color L*a*b*, en función del tratamiento térmico a GB

Muestra	L*	a*	b*
GB Control	$63,9 \pm 0,9^{d}$	$6,9 \pm 0,2^{b}$	$24,4 \pm 0,6^{c}$
T1	$60,0 \pm 0,4^{c}$	$5,9 \pm 0,1^{a}$	$21,6 \pm 0,4^{b}$
T2	$55,9 \pm 0,2^{b}$	$6,7 \pm 0,3^{b}$	$20,4 \pm 0,4^{a}$
T3	$52,9 \pm 0,4^{a}$	$13,5 \pm 0,1^{c}$	$28,5 \pm 0,3^{d}$

***Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (HSD Tukey).**

La luminosidad (L*), disminuyo significativamente en todos los tratamientos térmicos ($p<0.05$), siendo T3, el polvo más oscuro. Las coordenadas cromáticas a* y b* igualmente presentaron diferencias significativas; se resalta el incremento en estas dos coordenadas en la GB tratada con calor seco (T3). Por su parte T1 y T2 presentaron un descenso en estas coordenadas cromáticas en comparación con el control. El marcado descenso de la L* en la GB tratada térmicamente con calor seco es concordante con lo descrito por Castel et al., (2018). Al relacionar el efecto sobre el color y los MRP´s detectados en los tratamientos térmicos en

solución y con calor seco, se podría llegar a inferir que las bases de Shiff y compuestos de Amadori generan esta dinámica en el color, pero estos compuestos iniciales son incoloros, detectados en el rango ultravioleta y no en el visible, por ende, algunos intermediarios de mayor peso molecular estarían encargados de estos cambios (MacDougall & Granov, 2005). En la figura 5., se pueden observar los polvos analizados.

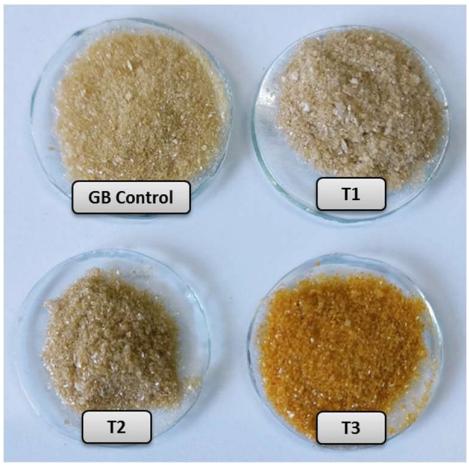


Figura 5. GB liofilizada, tratadas térmicamente en solución (T1, T2) y con calor seco (T3).

La diferencia total de color o coordenada de color absoluto, es una comparación numérica entre la muestra y un estándar, en este caso, GB Control. Por otra parte, el índice de color, relaciona un valor numérico (CI*) con un conjunto más reducido de colores (Tabla 1) (Murillo-Martínez et al., 2011). Como se lista en la tabla N. 4., las coordenadas de color absoluto (ΔE^*_{ab}) de las muestras tratadas térmicamente, son significativamente superiores a la de GB control ($p<0.05$), indicando diferencias apreciables como efecto neto del descenso en la luminosidad y modificaciones en los ejes cromáticos a* y b*.

Tabla 4. Diferencia total de color (ΔE_{ab}) e Índice de color (CI*) en GB tratadas térmicamente.

Muestra	ΔE^*_{ab}	CI*
GB Control	0	$4,41 \pm 0,09^a$
T1	$4,89 \pm 0,66^a$	$4,60 \pm 0,11^a$
T2	$9,00 \pm 0,41^b$	$5,91 \pm 0,18^b$
T3	$13,39 \pm 1,05^c$	$8,94 \pm 0,17^c$

***Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (HSD Tukey).**

Como se aprecia en la figura 5, tan solo la aplicación de vapor fluente por 15 min a presión atmosférica, modifico apreciablemente el color, esta misma tendencia se observó al aplicar vapor a presión (T2), y se acentuó con el uso de calor seco (T3) ($p<0.05$). El índice de color de las 4 muestras analizadas varió significativamente ($p<0.05$) de 4,41 ± 0,09 en la GB control hasta 8,94 ± 0,17 en la muestra T3 (tratada con calor seco). Este rango de variación del índice de color indicaría que la GB cambia de tonalidades que van del amarillo (GB control) hasta el naranja intenso. Estas tonalidades amarillo-marrones han sido relacionadas con interacciones entre aldehídos-proteínas en algunos intermediarios, así como los marrones con productos finales de reacción de Maillard (MacDougall & Granov, 2005; Morales & Jiménez-Pérez, 2001).

3.5 Contenido Fenólico Total (CFT) y actividad antirradicalaria ($ABTS^{\bullet+}$)

Los compuestos fenólicos son moléculas bioactivas comúnmente presente en las plantas como resultado de su metabolismo secundario. Su relevancia está ligada a diversas bioactividades como la antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antiproliferativa y, resultan de interés para la industria por su potencial como preservantes naturales, antioxidantes entre otras aplicaciones (R. Albuquerque et al., 2021). El contenido fenólico total de la GB (CFT), determinado espectrofotométricamente y su comportamiento luego de los tratamientos térmicos en solución y con calor seco, se presenta en la Tabla N. 5.

Tabla 5.Contenido fenólico total (CFT) y capacidad antirradicalaria ($ABTS^{\bullet+}$)

Muestra	gEqAG.Kg^{-1} GB	VCAC (mg EqAA/100 g GB)
GB Control	$3,15 \pm 0,28^a$	$155,46 \pm 9,18^a$
T1	$3,31 \pm 0,29^a$	$183,94 \pm 7,99^a$
T2	$3,99 \pm 0,23^b$	$259,85 \pm 13,64^b$
T3	$12,35 \pm 0,40^c$	$552,55 \pm 24,19^c$

*** Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (HSD Tukey).**

El CFT vario significativamente en las muestras analizadas ($p>0.05$). GB Control y T1 (vapor fluente) se comportaron de manera similar ($p>0.05$), registrando la menor concentración de estos metabolitos. Esto indica que la aplicación de vapor fluente (100 °C, 15 min) no generó modificaciones apreciables en esta variable en comparación con GB control. Por su parte, el tratamiento con vapor a presión (esterilización) causó un incremento en el CFT de la GB siendo

este superior al control y al efecto que tuvo el vapor fluente. Por su parte T3, mostro un incremento abrupto en el CFT, este fue 3,1 veces superior al determinado en la GB control. Reportes acerca del contenido fenólico en GB son reducidos y más aún cuando se estudia su respuesta ante diversos tratamientos térmicos, información que es escaza en la actualidad. (Castel et al., 2016) reportó un contenido fenólico significativamente superior al estimado en la GB Control, dicho valor (12,5 ± 0,4 g EqAG.Kg^{-1}peso fresco), solo muestra similitud con el encontrado en la GB tratada térmicamente (12,35 ± 0,4 gEqAG.Kg^{-1}peso fresco), sin embargo el CFT en la GB control continua siendo superior al reportado en goma arábiga (2,0 ± 0,4 gEqAG.Kg^{-1}peso fresco).

Algunas gomas alimentarias como goma arábiga, goma cordia (*Cordia myxa*) (Hasani & Yazdanpanah, 2020) y de acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio, la GB (*Cercidium praecox)*, puede representar una fuente interesante de compuestos con actividad biológica (Chaudhari & Annapure, 2020). Su concentración en la matriz está potencialmente relacionada con los tratamientos a los cuales se someten durante el procesado. Los tratamientos con vapor fluente y vapor a presión no generaron cambios substanciales en CFT, estos fueron acentuados cuando se usó calor seco. Se ha documentado que la aplicación de tratamientos térmicos a alta temperatura y baja humedad (120°C, 90 min) a cáscaras de pomelo *(Citrus paradisi* Changshanhuyou) en polvo, resultaron en modificaciones en el perfil y concentración de los fenoles. Algunos en su forma química libre pertenecientes al ácido cinámico (p-cumárico, ferúlico, sinápico) o derivados del ácido benzoico (p-hidroxibenzoico, vanílico), registraron incremento (Xu et al., 2007).

Un sistema complejo como el observado composicionalmente en goma brea (mayoritariamente polisacárido, fracción polisácarido-proteina, proteínas de variada masa molar) y adicional a esto, compuestos fenólicos, permiten inferir que podrían tener una respuesta al procesado térmico similar al del tostado de productos como el café. Durante la transferencia de energía los polisacáridos reaccionan con proteínas, fenoles y azucares dando lugar a la formación de melanoidinas; detectadas espectrofotométricamente (Abs_{420}).

La tostión, también promueve la despolimerización y desramificación de polisacáridos, que luego estarán involucrados en la formación de diferentes estructuras químicas por reacción de transglicosilación (TGR) no enzimática. En sistemas modelo se detectó, que compuestos fenólicos (ácidos clorogénicos) pueden unirse glucosídicamente a los carbohidratos bajo condiciones de alta temperatura y baja humedad, llevando a la formación de melanoidinas de gran diversidad (Moreira et al., 2017).

Es conocido que los MRP´s pueden influenciar la estabilidad oxidativa y el tiempo de vida de productos como cereales, lácteos o cárnicos (Nooshkam et al., 2019). Algunas fracciones de estos MRP´s han mostrado una fuerte actividad antioxidante y se sospecha que el principal mecanismo de acción es su habilidad para capturar metabolitos electrofílicos cargados positivamente, eliminar radicales oxígeno y quelar metales, tales como el hierro para formar complejos inactivos (Morales & Jiménez-Pérez, 2001).

Considerando los cambios en los marcadores de MRP´s medidos a diferentes λ, así como su correlación con la dinámica en los parámetros colorimétricos, se determinó la capacidad de la GB tratada térmicamente para estabilizar el radical sintético $ABTS^{\bullet+}$. Los valores expresados como mgEq AA/100 g de GB, se listan en la Tabla 5.

De los resultados obtenidos se pueden concluir que la GB control presenta una discreta actividad estabilizante del radical $ABTS^{\bullet+}$, cuando se aplicó vapor fluente esta no experimentó cambios apreciables en su capacidad, comportándose similar al control ($p>0.05$). Cuando la goma se trató con vapor a presión, esta experimentó un incremento de 1,67 veces en su capacidad estabilizante de radicales el comparar con GB control ($p<0.05$), pero un cambio abrupto fue el hallado en la aplicación de calor seco; la muestra T3 registro un incremento en su actividad de 3,55 veces la registrada la GB control ($p<0.05$).

Inicialmente se había relacionado un aumento en la actividad antioxidante con el progreso del pardeamiento no enzimático, en especial con productos de alto peso molecular como los formados en procesos tardíos de glicación avanzada (Liu & Kitts, 2011), por el contrario, la máxima fluorescencia observada en compuestos intermediarios si ha resultado aceptable como indicador de su actividad antioxidante y puede ser aplicada en sistemas en los cuales un exceso de pardeamiento no es deseado (Morales & Jiménez-Pérez, 2001).

Si bien, la actividad antioxidante *in vitro* expresada por la GB en su forma natural y tratada térmicamente puede ser explicada en parte por la formación de productos de diferente masa molar durante la reacción de Maillard, se puede notar que otros compuestos como los fenoles, igualmente ejercen un rol importante, hecho que requiere un estudio más profundo para dilucidar estructuras químicas y mecanismos de acción que expliquen su bioactividad.

3.6 Actividad antifúngica *in vitro*

El uso continuo de fungicidas sintéticos, ha planteado diversas inquietudes por las posibles implicaciones que tienen los residuos químicos sobre la salud, el ambiente y la proliferación de fitopatógenos resistentes (Palou et al., 2015). Algunos hidrocoloides como el quitosano han demostrado poseer actividad antifúngica, atribuida a su capacidad para protonarse en medio ácido (Ing et al., 2012). En este sentido, se evaluó la posible actividad antifúngica de la GB tratada térmicamente o no, los resultados del método de difusión en agar mostraron que la GB a una concentración de 10% p/p no posee actividad antifúngica frente a los fitopatógenos .*Penicillium glabrum* (Figura 6)*, Aspergillus niger* (Figura 7)*, Penicillium auranteogriseum* (Figura 8) *y Alternaria tenuissima* (Figura 9).

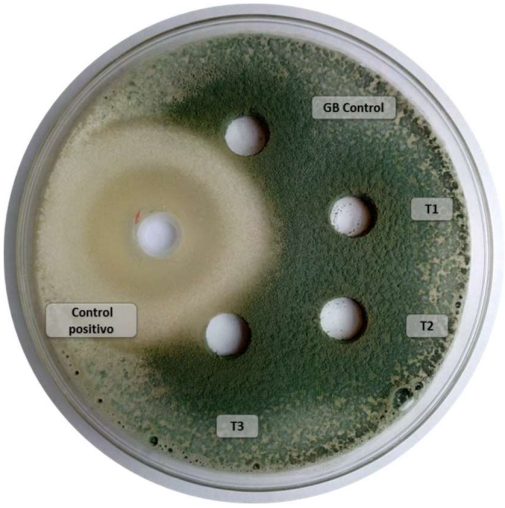


Figura 6.Susceptibilidad de *P. glabrum* a frente GB

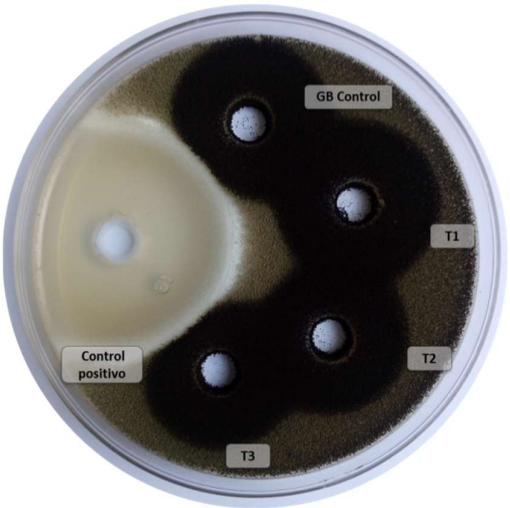


Figura 7.Susceptibilidad de *A. niger* frente a GB

Respecto al control positivo, se puede mencionar que Boscalid ejerce una significativa actividad antifúngica, excepto frente a *A. tenuisssima*, que registro halo de menor crecimiento pero no de inhibición. Posiblemente este patógeno tenga un grado de resistencia a esta carboxamida. Hecho que ha sido recientemente documentado en miembros del género *Alternaria spp*., frente a este mismo fungicida en aplicaciones comerciales (Avenot y Michailides, 2020). Algunos ensayos frente a bacterias patógenas como *E. coli* han corroborado el efecto antagonista de melanoidinas en la disrupción de la membrana celular (Rurián-Henares & Morales, 2008), efecto quelante del complejo sidereoforo-Fe^{3+}, remoción del catión Mg^{2+} (Rufián-Henares & de la Cueva, 2009) además de su capacidad para liberar H_2O_2, razón por la cual fueron usadas en el desarrollo de empaques activos (Hauser et al., 2014).

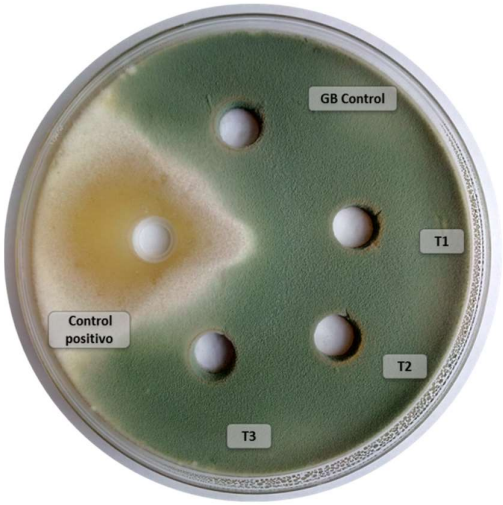


Figura 7. Susceptibilidad de *P. auranteogriseum* frente a GB

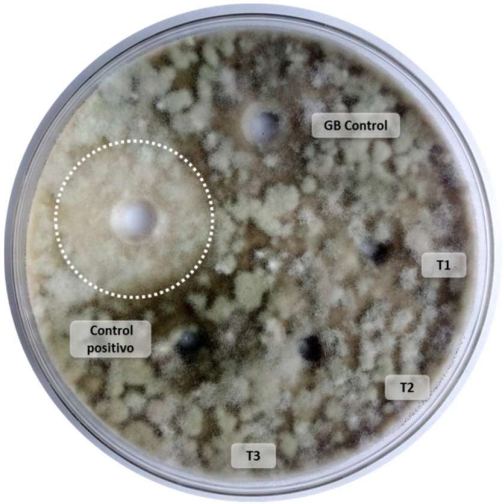


Figura 9. Susceptibilidad de *A. tenuissima* frente a GB.

4. Conclusiones

El procesado térmico de la GB en solución (vapor fluente, esterilización) así como calor seco, ejerce

modificaciones apreciables en el tamaño y distribución de las partículas, hecho dependiente de las posibles interacciones que se generan bajo condiciones de alta o baja humedad. La obtención de nanocoloides, después del tratamiento con calor seco es quizás uno de los aspectos más interesantes por sus potenciales aplicaciones y contribuir en explicar cómo la GB tratada térmicamente con calor seco permite obtener soluciones de muy baja turbiedad y mejores propiedades interfaciales. Los MRP´s iniciales, intermediarios o finales (melanoidinas) encontrados en todos los tratamientos están potencialmente relacionados con su actividad antioxidante y se correlacionan con la dinámica observada en sus parámetros colorimétricos. La GB (10 % p/p) sin o con tratamientos térmicos no ejerce actividad antifúngica frente a los fitopatógenos: *P glabrum*, *A. niger, P. auranteogriseum* ni *A. tenuissima*.

Referencias

Alesso, S. P., Araujo, P., & Tapias, R. (2003). *Aprovechamiento de la goma de brea (Cercidium praecox) en bosques secundarios del Parque Chaqueño Seco*. Influencia del tamaño de las heridas sobre la producción. 10, 60-70.

Avenot, H. F., & Michailides, T. J. (2020). *Occurrence and Extent of Boscalid Resistance in Populations of Alternaria alternata from California Pistachio Orchards*. Plant Disease, 104(2), 306-314.

Castel, V., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2018). *Improvement of emulsifying properties of Brea gum by controlled thermal treatment*. Food Hydrocolloids, 85, 93-101.

Castel, V., Zivanovic, S., Jurat-Fuentes, J. L., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., Carrara, C. R., & Harte, F. M. (2016). *Chromatographic fractionation and molecular mass characterization of Cercidium praecox (Brea) gum*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(13), 4345-4350.

Cecchini, J. P., Spotti, M. J., Piagentini, A. M., Milt, V. G., & Carrara, C. R. (2017). *Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum.* Food Science and Technology International 23(4), 371-381.

Chang, C., Xu, Y., Shi, M., Su, Y., Li, X., Li, J., & Yang, Y. (2020). *Effect of dry-heat and guar gum on properties of egg white powder: Analysis of forming capacity and baking performance*. Food Hydrocolloids, 99, 105333.

Chaudhari, B. B., & Annapure, U. S. (2020). *Physiochemical and rheological characterization of pithecellobium dulce (Roxb.) benth gum exudate as a potential wall material for the encapsulation of rosemary oil*. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 1, 100005.

Chawla, S. P., Chander, R., & Sharma, A. (2009). *Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins*. Food Chemistry, 116(1), 122-128.

Chen, W., Ma, X., Wang, W., Lv, R., Guo, M., Ding, T., Ye, X., Miao, S., & Liu, D. (2019). *Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound maillard reaction*. Food Hydrocolloids, 95, 298-307.

Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafgui, K., Kadri, A., & Gharsallah, N. (2019). *Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars.* Arabian Journal of Chemistry, 12(8), 3075-3086.

Escriche, I., & Juan-Borrás, M. (2018). *Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis*. Food Research International, 106, 834-841.

Finos, M. B., Deseta, M. L., Sponton, O. E., Frisón, L. N., Musumeci, M. A., Santiago, L. G., & Perez, A. A. (2021). *Evaluation of ovalbumin nanocarriers to promote the vehiculization and antifungal properties of cinnamaldehyde in aqueous media.* LWT, 151, 112224.

Hasani, M., & Yazdanpanah, S. (2020). *The Effects of Gum Cordia on the Physicochemical, Textural, Rheological, Microstructural, and Sensorial Properties of Apple Jelly*. Journal of Food Quality, 2020, e8818960.

Hauser, C., Müller, U., Sauer, T., Augner, K., & Pischetsrieder, M. (2014). *Maillard reaction products as antimicrobial components for packaging films*. Food Chemistry, 145, 608-613.

Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). *Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties*. International Journal of Biomaterials, 2012, e632698.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). *Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos*. Food Science and Technology, 24, 691-693.

Liu, Y., & Kitts, D. D. (2011). *Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews*. Food Research International, 44(8), 2418-2424.

López, E. P., & Jiménez, P. L. (2016). *Effect of different proportions of brea gum in the functional characteristics of wheat flour starch*: Impact on the physical quality of bread. Food Science and Technology, 36, 83-89.

López, E. P., Pérez, G. T., Erramouspe, P. L. J. de, & Cuevas, C. M. (2013). *Effect of Brea Gum on the characteristics of wheat bread at different storage times.* Food Science and Technology, 33, 745-752.

Loyeau, P. A., Spotti, M. J., Vanden Braber, N. L., Rossi, Y. E., Montenegro, M. A., Vinderola, G., & Carrara, C. R. (2018). *Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. Lactis INL1 using whey proteins and dextrans* conjugates as wall materials. Food Hydrocolloids, 85, 129-135.

MacDougall, D. B., & Granov, M. (2005). *Relationship between Ultraviolet and Visible Spectra in Maillard Reactions and CIELAB Colour Space and Visual Appearance.* En J. O'Brien, H. E. Nursten, M. J. C. Crabbe, & J. M. Ames (Eds.), The Maillard Reaction in Foods and Medicine (pp. 160-165). Woodhead Publishing.

Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2001). *Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence*. Food Chemistry, 72(1), 119-125.

Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Simões, C., Maciel, E., Domingues, P., Domingues, M. R. M., & Coimbra, M. A. (2017). *Transglycosylation reactions, a main mechanism of phenolics incorporation in coffee melanoidins*: Inhibition by Maillard reaction. Food Chemistry, 227, 422-431.

Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Ferez, A., & Vernon-Carter, E. J. (2011). *Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties*. Food Hydrocolloids, 25(4), 577-585.

Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). *The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems*. Food Chemistry, 275, 644-660.

Nunes, L., & Tavares, G. M. (2019). *Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins*. Trends in Food Science & Technology, 90, 88-99.

Palou, L., Valencia-Chamorro, S. A., & Pérez-Gago, M. B. (2015). *Antifungal Edible Coatings for Fresh Citrus Fruit: A Review*. Coatings, 5(4), 962-986.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3.ª ed.). Springer US.

R. Albuquerque, B., A. Heleno, S., P. Oliveira, M. B. P., Barros, L., & R. Ferreira, I. C. F. (2021). *Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges.* Food & Function, 12(1), 14-29.

Razavi, S. M. A. (2019). *Emerging Natural Hydrocolloids: Rheology and Functions*. John Wiley & Sons.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 26(9), 1231-1237.

Rufián-Henares, J. A., & de la Cueva, S. P. (2009). *Antimicrobial activity of coffee melanoidins-a study of their metal-chelating properties.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(2), 432-438.

Rurián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2008). *Antimicrobial activity of melanoidins against Escherichia coli is mediated by a membrane-damage mechanism.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(7), 2357-2362.

Setiowati, A. D., Wijaya, W., & Van der Meeren, P. (2020). *Whey protein-polysaccharide conjugates obtained via dry heat treatment to improve the heat stability of whey protein stabilized emulsions*. Trends in Food Science & Technology, 98, 150-161.

Slavutsky, A. M., & Bertuzzi, M. A. (2019). *Formulation and characterization of hydrogel based on pectin and brea gum.* International

Journal of Biological Macromolecules, 123, 784-791.

Slavutsky, A. M., Gamboni, J. E., & Bertuzzi, M. A. (2018). *Formulation and characterization of bilayer films based on Brea gum and Pectin*. Brazilian Journal of Food Technology, 21.

Spotti, M. L., Cecchini, J. P., Spotti, M. J., & Carrara, C. R. (2016). *Brea Gum (from Cercidium praecox) as a structural support for emulsion-based edible films*. LWT - Food Science and Technology, 68, 127-134.

Sznaider, F., Rojas, A. M., Stortz, C. A., & Navarro, D. A. (2020). *Chemical structure and rheological studies of arabinoglucuronoxylans from the Cercidium praecox exudate brea gum*. Carbohydrate Polymers, 228, 115388.

Ulagesan, S., & Kim, H. J. (2018). *Antibacterial and Antifungal Activities of Proteins Extracted from Seven Different Snails*. Applied Sciences, 8(8), 1362.

von Müller, A. R., López, C. B., Eynard, A. R., & Guzmán, C. A. (2009). *Subchronic toxicological evaluation of brea gum (Parkinsonia preacox) as a food additive in BALB/c mice*. Drug and Chemical Toxicology, 32(4), 307-311.

Wang, H.-Y., Qian, H., & Yao, W.-R. (2011). *Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity*. Food Chemistry, 128(3), 573-584.

Weijers, M., Sagis, L. M. C., Veerman, C., Sperber, B., & van der Linden, E. (2002). *Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength.* Food Hydrocolloids, 16(3), 269-276.

Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). *Effect of Heat Treatment on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(2), 330-335.

Zha, F., Dong, S., Rao, J., & Chen, B. (2019). *The structural modification of pea protein concentrate with gum Arabic by controlled Maillard reaction enhances its functional properties and flavor attributes*. Food Hydrocolloids, 92, 30-40.

Zhong, Z., & Xiong, Y. L. (2020). *Thermosonication-induced structural changes and solution properties of mung bean protein*. Ultrasonics Sonochemistry, 62, 104908. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104908

40TCA - Evaluación del desempeño de proteínas y mezclas proteicas vegetales comerciales, en formulaciones de baños o coberturas y su aplicación práctica en productos horneados dulces para el reemplazo de albúmina de huevo.

Evaluation of the performance of commercial vegetable proteins and protein mixtures, in topping or glazes formulations and its practical application in sweet baked goods for egg albumin replacement.

Andrea Villarreal[1], María Paula Sancho[1], Liliana Elisabeth Heinrich[1], Alicia del Valle Gallo[1]

1. Universidad Nacional de Luján. Ruta 5 y 7. andreavillarreal_29@hotmail.com

Resumen

Las proteínas, así como hidrolizados, aislados y concentrados, se emplean como agentes de retención de agua, espumantes y gelificantes. Una aplicación de interés es la formulación de coberturas para productos horneados, buscando reemplazar a la albúmina, ingrediente tradicional, declarada como alérgeno. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño de mezclas de proteínas vegetales de diferentes fuentes como agentes de cobertura de productos horneados dulces, en reemplazo de ingredientes con alergenicidad. Se emplearon muestras proteicas en polvo (trigo, poroto mung, arroz, arveja, haba y garbanzo), previamente caracterizadas (pH, humedad, densidad aparente, color, solubilidad, overrun y capacidad de retención de agua) y se desarrollaron coberturas caracterizándolas en húmedo y luego del secado (pH, humedad, actividad de agua y color). Con proteínas de trigo se obtuvo mayor volumen, con estructura similar a merengues. El resto de las mezclas generan coberturas livianas y translucidas. Esta diferenciación no se transforma en limitante para su aplicación, ya que al estar distribuidas sobre el soporte alimenticio (madalenas, tapas de alfajores) logran glaseados atractivos tanto en bases de color claro (vainilla) como en oscuras (chocolate). El uso de proteínas y mezclas vegetales proteicas constituye una alternativa ventajosa para el reemplazo de albúmina en coberturas y glaseados para numerosas aplicaciones industriales.

Palabras clave: Proteínas vegetales, coberturas, merengue, glasé.

Abstract

Proteins, as well as hydrolysates, isolates and concentrates, are used as water retention, foaming and gelling agents. An application of particular interest is the formulation of toppings for baked products in an attempt to replace albumin, a traditional ingredient labeled as allergen. The purpose of this research study was to evaluate the performance of vegetable protein mixtures from different sources as covering agents for sweet baked goods, in replacement of ingredients with allergenicity. Protein powder samples (wheat, mung beans, rice, peas, broad beans and chickpeas) were use and previously characterized for pH, humidity, bulk density, color, solubility, overrun and water retention capacity. Toppings were developed and characterized, both wet and after drying (pH, humidity, water activity and color). Wheat proteins resulted in higher volume, with a meringue-like structure. The rest of the mixtures resulted in light and translucent toppings. However, this difference does not limit their application since, when spread over the food substrate (muffins, sandwich biscuit with caramel filling (alfajores)), they produce attractive glazes both over light (vanilla) and dark (chocolate) bases. The use of proteins and vegetable protein mixtures proved to be an advantageous alternative to replace albumin in toppings and glazes for numerous industrial applications.

Keywords: Vegetal protein, frosting, topping, glaze, meringue.

1. Introducción

Las proteínas constituyen uno de los macronutrientes principales para la alimentación humana (Muhammad, A. y Pauls, K.P., 2018) y como ingredientes alimentarios presentan propiedades funcionales de interés, como agentes de retención de agua, espesantes, espumantes y gelificantes.

Entre otras posibles clasificaciones, las proteínas se pueden agrupar en dos grandes grupos según su origen: animal y vegetal. Las características, las tecnologías de obtención y los usos de las proteínas animales han sido mucho más estudiadas, en cambio, los aspectos relacionados a las proteínas vegetales son relativamente nuevos. Asimismo, en la actualidad se dispone de subproductos como hidrolizados y aislados de proteínas vegetales, con funcionalidades especificas y que aportan a las formulaciones alimentarias. (Sim, S.Y.J. *et al.,* 2021).

Aún cuando es sabido que la calidad nutricional de las proteínas vegetales no es la misma que la de las proteínas animales, la demanda y las inversiones relacionadas a su I+D, su producción y la aplicación en nuevos productos han ido en aumento (Aguilar, A., 2020). Esto se debe a diversas causas. Por un lado la tendencia hacia una alimentación con mayor cantidad de productos de origen vegetal, ya sea en forma exclusiva (veganismo), con algunos productos de origen animal (vegetarianismo) o para reducir la frecuencia de consumo de productos de origen animal (flexitarianismo). Y por otro, un aspecto de destacada importancia es que la proteína del huevo de gallina es causante de alergias alimentarias severas. (Vapor, A. *et al*., 2022). Por ello cobra relevancia su reemplazo por otras fuentes como las vegetales.

Las propiedades espumantes de las proteínas son importantes para predecir su funcionalidad y ya se han comparado proteínas de maíz, trigo y soja con las de leche descremada en polvo y clara de huevo en polvo, con buenos resultados en la expansión y en la estabilidad de la espuma (Vani, B. y Zayas, J.F., 2006) e incluso logrando mejores resultados en la densidad, la viscosidad aparente y el volumen después del horneado utilizando gluten hidrolizado de trigo en comparación con proteína de huevo de gallina (Wounters, A.G.B. *et al.,* 2018).

Muchos sistemas alimenticios son espumas o batidos, donde las proteínas son los agentes tensoactivos que favorecen la estabilización de la fase de aire dispersa. Los merengues corresponden a este tipo de estructura.

El Código Alimentario Argentino clasifica en los artículos 1410 y 1411 del Capítulo XIX a los derivados de las harinas en función de contenido proteico, definiendo a los concentrados proteínicos entre 65 y 90% y a los aislados proteínicos con un mínimo del 90% (N x 6,25).

Existen en el mercado varias proteínas vegetales comerciales y sus derivados. Algunas se emplean desde hace años (soja, trigo), otras han surgido en los últimos años debido a la demanda de mayores alternativas (arvejas, porotos, habas). Las mismas pueden usarse en gran cantidad de aplicaciones: cárnicos, helados, panificados, bebidas, snacks, pastas, salsas, aderezos, barras de cereales, etc. y se van encontrando nuevas aplicaciones y usos a medida que se experimenta con ellas.

En la industria de productos horneados dulces (galletitas, budines, alfajores, magdalenas), los merengues o baños son utilizados como coberturas que contribuyen al aspecto. Estas preparaciones se basan principalmente en azúcar, agua, proteína y otros aditivos como gelificantes, espesantes, conservantes. Si se requiere de una cobertura tipo merengue será necesaria la incorporación de aire mediante batido, mientras que también se emplean baños y coberturas que no requieren esta operación. La albúmina, por su capacidad espumante, es ampliamente utilizada para preparaciones de este tipo.

Durante el proceso de elaboración, almacenamiento y transporte de productos horneados glaseados, es de vital importancia lograr un producto aceptable, atractivo y resistente asociado a las coberturas. Ello implica a nivel industrial, características fundamentales como: velocidad de secado, resistencia a golpes, color, sabor neutro, desgranamiento, proporción cobertura / producto.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño de distintas proteínas vegetales o mezclas comerciales, incorporadas a formulaciones típicas de baños o coberturas en la elaboración de productos horneados dulces, para proveer una herramienta útil a la industria.

2. Materiales y métodos

Se emplearon muestras proteicas en polvo de cereales y legumbres: proteína de trigo hidrolizada (T), concentrado proteico de porotos mung (PM), de arroz (AZ), de arveja (AA), de haba (H) y de garbanzo (G), obtenidas de proveedores locales de

ingredientes para la industria alimenticia. Las mismas fueron caracterizadas físico-químicamente determinando pH, humedad, densidad aparente, color, solubilidad, overrun y capacidad de retención de agua. El pH se cuantificó por potenciometría utilizando un pHmetro de mesada (PH 211 HANNA Instruments, Rumania), en soluciones 10% p/v de las muestras proteicas. Para la humedad de los polvos, se utilizó termobalanza OHAUS MB 35, expresada en % p/p. La densidad aparente se determinó por pesada de un volumen conocido y se expresó en g/ml; el color empleando un fotocolorímetro Hunter LabMiniScan EZ, 4500 L, U.S.A. midiendo los parámetros cromáticos del espacio CIELAB (L*, a* y b*). La solubilidad se determinó de manera cualitativa, dejando en reposo durante 6 horas soluciones al 10 % p/v de cada muestra proteica, colocadas en probetas de 10 ml y se observó luego de transcurrido el tiempo, el estado de la solución y la formación o no de precipitado. Para obtener un valor de overrun (OR) se empleó una metodología habitual en la industria. Se utilizó la ecuación (1), donde Pvm es el peso de un volumen conocido de mezcla, y Pvb es el peso para el mismo volumen de mezcla, pero luego de ser batida.

$$\%Overrun = \frac{Pvm - Pvb}{Pvb} x\ 100 \qquad (1)$$

Para la capacidad de retención de agua (CRA) se pesaron 250 mg de muestra de cada proteína, se disolvieron en 10 ml de agua destilada en tubos de centrífuga, se agitó en vortex durante 30 segundos, luego se dejó reposar 3 horas a temperatura ambiente y se centrifugo a 2000 rpm durante 30 minutos en centrífuga CAVOUR VT 3216, se determinó el volumen sobrenadante y la CRA se expresó como ml de agua absorbida por 1 g de muestra, metodología adaptada de (Prosekov, A. *et al.,* 2018).

Las coberturas se elaboraron empleando una fórmula base industrial para este tipo de productos que incluye: azúcar común tipo A, agua, azúcar impalpable, gelatina sin sabor de 220 bloom, proteína vegetal. En la Tabla 1 se detalla la composición porcentual de la fórmula base.

Tabla 1. Formulación base de cobertura

Ingredientes	Composición porcentual
Agua	27,06
Azúcar común tipo A	53,08
Azúcar impalpable	17,83
Proteína vegetal	0,828
Gelatina sin sabor 220 bloom	0,637

Para la elaboración de las coberturas, previamente se preparó un jarabe llevando a ebullición azúcar común y agua hasta alcanzar un rango de 75 a 78 grados Brix, que se cuantificaron con refractómetro HI96801 HANNA Instruments, Rumania. También se preparó un "montado", como se denomina usualmente en la industria, batiendo durante un minuto la proteína vegetal, azúcar impalpable y la gelatina previamente hidratada en una pequeña proporción de agua.

El baño glaseado se elaboró batiendo un minuto una mezcla de jarabe y el "montado".

Esta preparación se repitió para cada una de las muestras proteicas vegetales analizadas. Las coberturas húmedas así obtenidas, fueron caracterizadas determinando pH, humedad y actividad de agua. Posteriormente las muestras se secaron colocando 10 gramos de cada cobertura extendida en una fina capa sobre placa de petri invertida, durante 15 minutos en estufa SAN JOR de aire forzado a 70 ºC. Al final del proceso, se determinó el color y aw.

Las diferentes coberturas húmedas formuladas se aplicaron sobre productos panificados horneados tipo madalenas y tapas de alfajor, y se secaron en estufa a 70ºC durante 15 minutos. Se evaluaron cualitativamente capacidad de cobertura y aspecto.

3. Resultados y Discusión

La caracterización de las muestras proteicas se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos de las muestras proteicas vegetales

	Muestras					
Parámetro	T	PM	AZ	AA	H	G
pH	12,6	7,215	6,625	6,395	7,15	6,345
Humedad % m/m	8,14	8,58	4,755	8,025	8,135	8,85
Densidad ap. g/ml	3,526	4,891	5,003	5,672	5,143	5,588
Overrun %	268,52	4,03	2,47	0,7	1,28	0,63
CRA, ml/ g	0,068	5,320	2,368	3,048	6,448	1,012

La muestra T presenta un pH significativamente superior al resto, esto se debe a que la misma es hidrolizada a diferencia de las demás que son concentrados proteicos con aproximadamente entre 80 a 88 % de proteína. La hidrólisis de proteínas disocia agregados insolubles, produce péptidos más pequeños, aumenta la exposición de grupos hidrofílicos y facilita la interacción de aminoácidos hidrofílicos con el medio acuoso, lo que lleva a un aumento de solvatación y solubilidad de los concentrados proteicos (Aluko, R. y Monu, L. 2003).

El porcentaje de humedad en la mayoría se encuentra alrededor de 8%, a diferencia de la muestra AZ que es aproximadamente la mitad. Todos estos valores son los deseados industrialmente, ya que se requiere que sea menor a un 10% para evitar inconvenientes tecnológicos o ajustes de formulaciones.

T muestra un valor de densidad menor respecto a las demás muestras que arrojaron valores similares.

La proteína vegetal de trigo hidrolizada arrojó un valor de OR muy alto respecto de las muestras restantes, por tal motivo T se considera un buen agente de batido para una amplia variedad de aplicaciones.

La Figura 1 muestra el estado inicial (A) y final (B) del ensayo de solubilidad. La proteína de trigo fue la más soluble. Mientras que en las mezclas proteicas de porotos mung y habas se solubilizaron parcialmente, en las restantes se observó un precipitado en el fondo de las probetas.

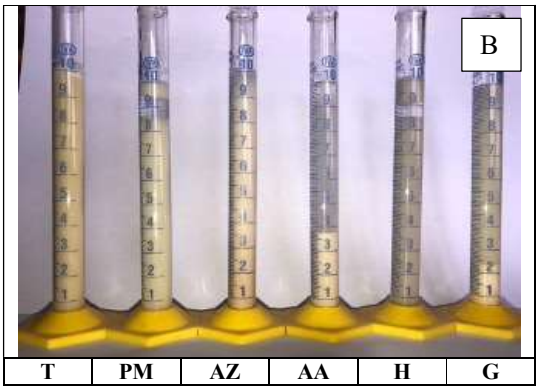


Figura 1: Ensayo de solubilidad cualitativo inicial (A) y final (B). (soluciones 10% p/v de muestras proteicas vegetales en tiempo final 6 horas. T: proteína de trigo hidrolizada-PM: concentrado de proteína de porotos Mung -AZ: concentrado de proteína de arroz -AA: concentrado de proteína de arvejas -H: concentrado de proteínas de habas -G: concentrado de proteínas de garbanzo)

Este ensayo es de fácil realización para su implementación en pequeños laboratorios de desarrollo en la industria de horneados dulces.

Las muestras PM y H presentaron mayor CRA. En el caso de proteínas de habas (Żmudziński, D. *et al.,* 2021) encontró valores similares. (Tabla 3)

Tabla 3. Capacidad de retención de agua (CRA) de las muestras proteicas

Muestra	CRA ml/g
T	0,068
PM	5,320
AZ	2,368
AA	3,048
H	6,448
G	1,012

Con respecto al aspecto y color, todos los polvos de las muestras proteicas son impalpables y visualmente amarillos muy tenues. Las muestras H y AZ son ligeramente más oscuras, reflejado en un valor de luminosidad menor. Esta aproximación de color de los compuestos en polvo se deben contrastar con las coberturas ya formadas. En la tabla 4 se detallan los parámetros de color y las imágenes de los polvos de todas las muestras.

Tabla 4. Parámetros cromáticos de las muestras de proteínas vegetales

Muestras	L	b*	a*	Imagen muestra proteica polvo
T	88,755	-0,405	18,5	
PM	88,435	0,295	19,55	
AZ	86,365	2,295	14,165	
AA	90,17	2,045	19,845	
H	84,98	0,64	14,2	
G	88,935	1,185	23,215	

Los resultados de caracterizar las coberturas obtenidas de las distintas muestras proteicas vegetales se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Caracterización de coberturas (en húmedo y seco)

	Muestras					
Parámetros	T	PM	AZ	AA	H	G
pH	9,685	8,075	7,225	6,685	7,360	6,450
%H húmedo	21,025	18,200	13,960	9,410	16,240	4,980
%H seco	1,825	1,495	1,370	3,060	11,610	3,790
aw húmedo	0,844	0,877	0,862	0,844	0,845	0,845
aw seco	0,779	0,843	0,838	0,843	0,842	0,839

El rango de pH de las coberturas húmedas va desde 6,450 hasta 9,685 siendo este último valor de la muestra de T, concordante con el alto valor reflejado en la Tabla 2.

Para condiciones fijas de tiempo y temperatura que simulan el secado industrial, las muestras T, PM y AZ presentan menor porcentaje de humedad final, seguidas por AA y G. En el caso de la muestra H que presenta un elevado porcentaje de humedad será necesario establecer otros parámetros de secado o de espesor de cobertura, su uso sería beneficioso para productos con cobertura ligera en donde se visualiza la superficie del producto.

El parámetro aw previo y luego del secado de los extendidos de cobertura en las placas disminuyó en todas las muestras, para el caso de T, PM y AZ fue más notable. Este resultado indica la mejor condición de estabilidad, teniendo en consideración la aplicación de la cobertura sobre un producto comercial.

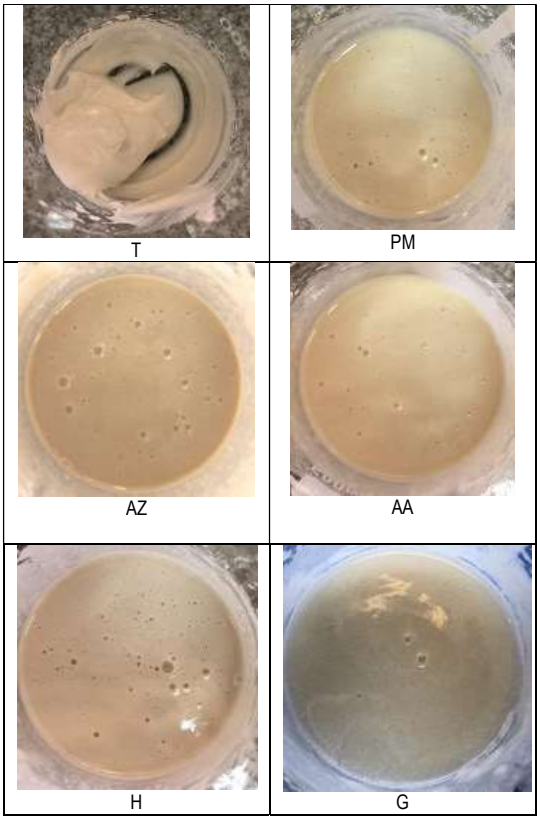


Figura 2. Fotografías de los "montados" de las muestras proteicas con azúcar impalpable, agua y gelatina. T: proteína de trigo hidrolizada-PM: concentrado de proteína de porotos Mung -AZ: concentrado de proteína de arroz -AA: concentrado de proteína de arvejas -H: concentrado de proteínas de habas -G: concentrado de proteínas de garbanzo

Tal como se observa en la Figura 2. Todos los "montados" presentaron pequeñas burbujas por incorporación de aire, se notaron cambios de color, tornándose más blanquecinos, y un aumento de volúmenes. Es de destacar que en T se produjo un aumento de volumen considerable, y un cambio en la consistencia durante el batido, particularmente luego del agregado del jarabe para formar las coberturas, lo que indica su potencialidad como agente de batido.

En cuanto al color la muestra T presentó la mayor luminosidad, y junto a sus características texturales se presenta como excelente alternativa para cobertura tipo "merengue italiano".

El resto de las muestras se mantienen fluidas, y tanto por su coloración como su estructura podrían utilizarse en baños tipos glasé y sumar alternativas con el agregado de colorantes.

Aun cuando los parámetros cromáticos indican una tonalidad ligeramente amarilla (Tabla 6), visualmente en las coberturas, no se percibe ninguna tonalidad marcada.

En cuanto al comportamiento como coberturas, todas las muestras ensayadas son fácilmente extendibles sobre una superficie, logrando cubrir de manera pareja y uniforme, lo que constituye una ventaja tecnológica para el uso en la industria.

Tabla 6. Parámetros cromáticos de mezcla proteica húmeda

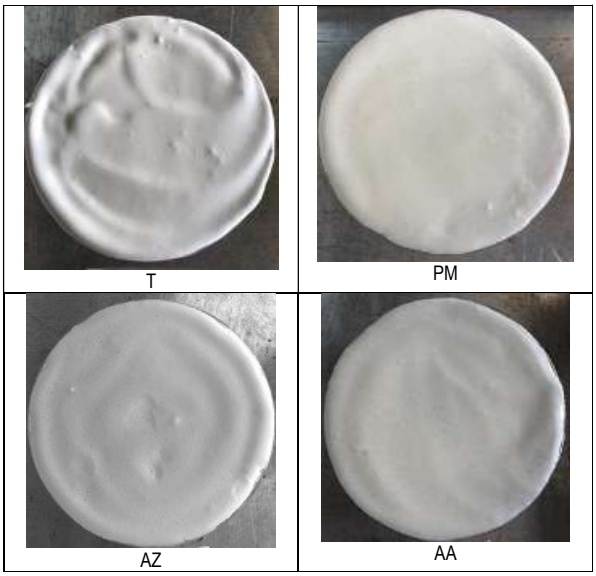
Muestras	L	b*	a*
T	95,040	-0,240	6,180
PM	79,775	-0,415	12,025
AZ	74,430	2,665	17,185
AA	81,310	0,280	13,605
H	81,175	0,180	10,985
G	77,780	-0,080	14,000

En la Figura 3 se observan los extendidos de las diferentes muestras, luego del secado. En la cobertura G se observan pequeños cristales superficiales, lo que indicaría la necesidad de adecuar la formulación, los tiempos de mezclado y de batido.

Un ensayo simple en una línea industrial de aplicación y secado de coberturas, consiste en efectuar un pequeña presión con el dedo pulgar sobre la superficie del producto horneado como un modo de anticipar el comportamiento o la resistencia a las operaciones de envasado, apilado y transporte.

La aplicación de las coberturas sobre productos horneados, madalenas y tapas de alfajores (Figuras 4.A, 4.B y 4.C) fue claramente diferencial según la formulación elegida.

La aplicación de T sobre las madalenas formó una capa de glaseado blanco y espeso, este comportamiento de las muestras de hidrolizados de trigo fue corroborada por Wounters, A.G.B. *et al.* (2018). Esta cobertura no solo se adhiere con facilidad, sino que genera una capa firme no quebradiza, lo que es una ventaja tecnológica, ya que sería capaz de soportar tensiones tanto en el envasado como en el transporte.



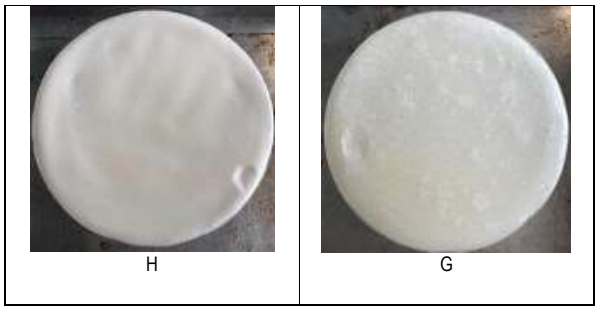


Figura 3. Coberturas secas de las distintas muestras proteicas T: proteína de trigo hidrolizada-PM: concentrado de proteína de porotos Mung -AZ: concentrado de proteína de arroz -AA: concentrado de proteína de arvejas -H: concentrado de proteínas de habas -G: concentrado de proteínas de garbanzo.

El resto de las coberturas generaron una capa delgada semi- traslúcida muy diferente de la correspondiente a T. Esto es característico de baños glaseados livianos tales como los que se aplican en budines, galletas con capas finas de glasé coloreado, etc.

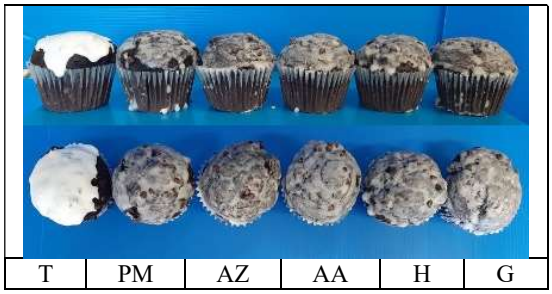


Figura 4.A: Aplicación de las distintas coberturas a partir de muestras proteicas vegetales en madalenas de chocolate - T: proteína de trigo hidrolizada-PM: concentrado de proteína de porotos Mung -AZ: concentrado de proteína de arroz -AA: concentrado de proteína de arvejas -H: concentrado de proteínas de habas -G: concentrado de proteínas de garbanzo

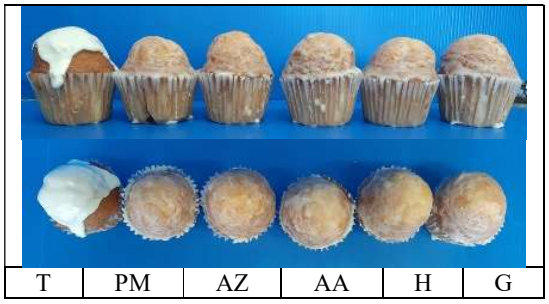


Figura 4.B: Aplicación de las distintas coberturas a partir de muestras proteicas vegetales en madalenas de vainilla - T: proteína de trigo hidrolizada-PM: concentrado de proteína de porotos Mung -AZ: concentrado de proteína de arroz -AA: concentrado de proteína de arvejas -H: concentrado de proteínas de habas -G: concentrado de proteínas de garbanzo

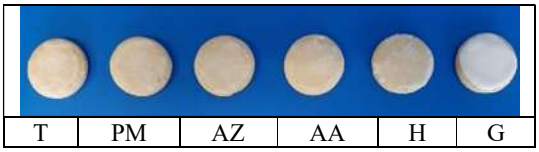


Figura 4.C: Aplicación de las distintas coberturas a partir de muestras proteicas vegetales en tapas de alfajores- T: proteína de trigo hidrolizada-PM: concentrado de proteína de porotos Mung -AZ: concentrado de proteína de arroz -AA: concentrado de proteína de arvejas -H: concentrado de proteínas de habas -G: concentrado de proteínas de garbanzo

4. Conclusiones

La proteína de trigo (T) mostró un comportamiento diferencial en sus propiedades de batido respecto a las de porotos mung (PM), arroz (AZ), arveja (AA), haba (H) y garbanzo (G), esto se debe fundamentalmente a su condición de hidrolizado. Se demuestra así que este tratamiento de hidrólisis otorga las propiedades de formación de espuma y abre un abanico de posibilidades para analizar distintos tratamientos enzimáticos sobre las mismas.

Existen en las coberturas diferencias tanto de consistencia como de aspecto y color. Resaltando la de trigo (T) como la más blanca (mayor L) y más densa.

Sin embargo, esta diferencia, no se transforma en limitante para la aplicación de glaseados de porotos mung (PM), arroz (AZ), arveja (AA), haba (H) y garbanzo (G), ya que al estar distribuidas sobre el soporte alimenticio (madalenas, tapas de alfajores) logran baños atractivos tanto en la base de color claro (vainilla) como en la base oscura (chocolate).

Las técnicas experimentales simples desarrolladas en este trabajo servirían como herramienta valiosa que permiten visualizar el comportamiento sobre la matriz en la que se aplicarían en la industria.

El uso de proteínas y mezclas vegetales proteicas como las ensayadas, constituye una alternativa ventajosa para el reemplazo de albúmina de huevo en coberturas y glaseados para numerosas aplicaciones industriales, logrando de este modo sustituir el ingrediente alergénico.

5. Referencias

Aguilar, A. (26 de noviembre de 2020). *El mercado de proteína vegetal está creciendo y esto es apenas el comienzo.* Goula. https://goula.lat/el-mercado-de-

proteina-vegetal-esta-creciendo-y-esto-es-apenas-el-comienzo/

Aluko, R.; Monu, L. (2003). *Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolisates*. Journal of Food Science. 68 (4), 1254 - 1258

Carp, D. J. (2001). *Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos*. [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio institucional de la Universidad de Buenos Aires. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3333_Carp.pdf

Castel, M. V. (2019). *Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química]. Repositorio institucional de la Universidad Nacional del Litoral. https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/212

Damodaran, S. y Paraf, A. (1997). *Food Proteins and Their Applications*. Marcel Dekker, Inc. New York

http://www.anmat.gov.ar. Código Alimentario Argentino.

Muhammad, A.; Pauls, K.P. (2018). Properties of Plant Proteins. En *Plant Bioproducts* (pp. 121 - 142)

Posekov, A., Babich, O., Kriger, O, Ivanova, S., Pavsky, V., Sukhikh Y.Y., y Kashirskin, E. (2018). *Functional properties of the enzyme-modified protein from oat bran*. Food Bioscience 24: 46-49.

Raymundo, A., Empis, J., y Sousa, I. (1998). *White lupin protein isolate as a foaming agent*. Z Lebensm Unters Forsch A, 207 :91–96

Sim, S.Y.J.; SRV, A.; Chiang, J.H.; Henry, C.J. (2021). *Plant Proteins for Future Foods: A Roadmap*. Foods 2021, 10, 1967. https://doi.org/10.3390/foods10081967

Vani, B., Zayas, J.F., (2006). *Foaming Properties of Selected Plant and Animal Proteins.* Journal of Food Science, 60(5):1025 – 1028

Vapor, A. y otros autores, (2022). *Processes for reducing egg allergenicity: Advances and different approaches*. Food Chemistry. Volume 367,130568

Wounters, A.G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., Delcour, J.A. (2018). *Enzymatically Hydrolyzed Wheat Gluten as a Foaming Agent in Food: Incorporation in a Meringue Recipe as a Proof-of-Concept.* Journal of Food Science. Aug;83(8):2119-2126

Żmudziński, D. y otros autores, (2021). *Functional and Rheological Properties of Vicia faba L. Protein Isolates.* Biomolecules. Feb; 11(2): 178.

42TCA - Pigmentos antocianos de frambuesa encapsulados por liofilización y secado spray y su aplicación en polvos para preparar bebidas analcohólicas.

Raspberry anthocyanin pigments encapsulated by lyophilization and spray drying and their application in powders to prepare nonalcoholic beverages.

Cecilia Csernoch[1], María Florencia Mazzobre[2], Gabriela Cano[3], Alicia Gallo[1].

1. Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina.
2. CONICET-FCEyN, Departamento de Industrias, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.
3. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires – Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina.
   E-mail: Ceciliacs2@hotmail.com

Resumen

Las frambuesas son ricas en compuestos fenólicos, entre los que se encuentran las antocianinas, que proporcionan alta capacidad antioxidante. El objetivo del trabajo fue estudiar encapsulados obtenidos por liofilización (CFL) y secado spray (CFS), evaluando sus compuestos bioactivos y propiedades fisicoquímicas, y analizar su aplicación como colorantes naturales en polvos para preparar bebidas analcohólicas. Se obtuvo un extracto acuoso concentrado de frambuesas, se mezcló con maltodextrina y se separó en dos muestras, una se liofilizó y otra se deshidrató por secado spray. Se midió humedad, actividad de agua, solubilidad, higroscopicidad, color, contenido de antocianinas, actividad antioxidante y fenoles totales en los pigmentos encapsulados. Se formuló una base de polvo para preparar bebidas hidroalcohólicas, se estudió la variación de color, pH y acidez titulable durante 12 meses. Los polvos microencapsulados mostraron buenas propiedades físico-químicas y alto contenido de compuestos bioactivos. La muestra CFS presentó mayor contenido de antocianinas y capacidad antioxidante. Los encapsulados presentaron una coloración rosa intensa, más destacada en CFS, que se evidenció en el parámetro cromático a*. Con ambas técnicas de encapsulación se obtuvieron buenos resultados en el desarrollo de colorantes naturales con propiedades funcionales, logrando preservar los compuestos bioactivos propios de la frambuesa. Sin embargo, el secado spray presentó mayor retención del pigmento antociano y capacidad antioxidante, además de utilizar menor gasto energético y menor tiempo de secado.

Palabras clave: antocianinas, liofilización, secado spray, colorantes naturales.

Abstract

Raspberries are rich in phenolic compounds, among which include anthocyanins, that provide high antioxidant capacity. The purpose of our research study was to study encapsulates obtained by freeze-drying (CFL) and spray drying (CFS), evaluating their bioactive compounds and physicochemical properties, and analyze their application as natural colorants in powders to prepare non-alcoholic beverages. A concentrated aqueous extract of raspberries was obtained, which was mixed with maltodextrin and separated into two samples: one of it was freeze-dried and the other one was dehydrated by spray drying. Moisture, water activity, solubility, hygroscopicity, color, anthocyanin content, antioxidant activity and total phenols were measured in the encapsulated pigments. A powder base was formulated to prepare non-alcoholic beverages; the variation of color, pH and titratable acidity was studied for 12 months. The microencapsulated powders showed good physical and chemical properties and high content of bioactive compounds. The CFS sample showed higher anthocyanin content and antioxidant capacity. The encapsulates presented an strong pink coloration, more prominent in CFS, which was evidenced in the chromatic parameter a *. Both encapsulation techniques showed good results as to the development of natural dyes with functional properties, thus preserving the raspberry bioactive compounds. However, spray drying showed greater retention of the anthocyanin pigment and antioxidant capacity, in addition to lower energy use and shorter drying time.

Keywords: anthocyanins, freeze-drying, spray drying, natural colorants.

1. Introducción

En los últimos años muchos países del mundo, incluido Argentina, vienen adoptando un estilo de vida más saludable, eligiendo una alimentación más sana y natural. En este contexto, la industria alimenticia se enfrentó con el desafío de desarrollar productos que presenten beneficios para la salud de los consumidores. En particular, la industria de los colorantes se encuentra en pleno desarrollo de alternativas que puedan sustituir a los colorantes artificiales, que si bien, presentan alta estabilidad, importante poder tintóreo y bajo costo, su consumo está siendo cuestionado por relacionarse con distintos trastornos como alergias e hiperactividad, particularmente en niños (Bateman *et al*., 2004; Amr y Al-Tamimi, 2007; Prado-Lobato *et al*., 2012). En este sentido, surgen los colorantes naturales, a partir de pigmentos extraídos de frutas y vegetales, pero debido a su inestabilidad resulta importante el estudio de distintas técnicas de encapsulación, para poder afrontar los principales factores que los alteran (pH, luz, humedad ambiente, tratamientos térmicos, procesos enzimáticos y de oxidación).

Los pigmentos naturales, además de dar color a los alimentos, aportan nutrientes adicionales, como vitaminas, minerales y fibras. Asimismo, los pigmentos están asociados a compuestos bioactivos que, si bien no son nutritivos, presentan propiedades benéficas para la salud, como los polifenoles y compuestos antioxidantes, (Bridgers *et al*., 2010; Li, 2013). Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides son una importante subcategoría, en la cual se encuentran las antocianinas (Strack y Wray, 1994). Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles, que aportan la tonalidad roja característica de los frutos rojos, en particular de las frambuesas (Damodarán *et al.*, 2010).

La encapsulación es un proceso en el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, aromas, colorantes, drogas, vitaminas, aceites esenciales, etc.) son introducidas en una matriz o sistema pared con el objetivo de controlar su liberación y para protegerlos frente a procesos como oxidación, evaporación, degradación térmica o migración en el alimento (Vilena *et al*., 2009; Messaoud *et al*., 2016). Además, permite mejora la biodisponibilidad y la estabilidad de los productos, así como la liberación del agente activo (Sagalowicz *et al*., 2006; Deladino *et al*., 2008).

La liofilización, es una técnica de encapsulación para la obtención de sistemas continuos deshidratados, consiste en la eliminación de agua de un producto mediante sublimación del agua libre de la fase sólida. Este proceso permite obtener productos deshidratados de alta calidad, debido a que se trabaja a bajas temperaturas. Además, la rígida estructura del producto congelado, permite que no ocurra encogimiento durante el proceso de secado. De este modo, se logra un producto con excelentes propiedades de disolución, rehidratación y alta retención de nutrientes (Ratti, 2001; López-Quiroga *et al*., 2019). Sin embargo, su desventaja es el largo tiempo del proceso (entre 24 y 48 horas) y el consumo de energía, además de la utilización de equipamiento específico costoso (Barbosa-Canovas y Vega-Mercado, 1996; Sousdale *et al*., 2013). Por otro lado, el secado spray o por atomización es la técnica de microencapsulación más utilizada en la industria alimentaria. El proceso consiste en atomizar el material que se encuentra en estado líquido, formando finas gotas sobre una corriente de aire caliente y se produce una rápida evaporación del solvente formándose una fina película del material de recubrimiento (Gharsallaoui *et al*., 2007). Las ventajas de esta técnica son principalmente su bajo costo de proceso, la rapidez y eficiencia del secado y el logro de una producción a gran escala en modo continuo (Poshadri y Kuna, 2010; Parra Huertas, 2010). Tanto en la encapsulación por secado spray como por liofilización, la sustancia a encapsular es rodeada por una matriz protectora, normalmente un polímero como maltodextrina, almidón, gomas y gelatina (Patel *et al*., 2016; Murali *et al*., 2019). Por ambos métodos se obtienen cápsulas con muy baja humedad, buena estabilidad y permiten conservar las propiedades nutritivas del compuesto activo.

El objetivo del trabajo fue estudiar encapsulados de extracto de frambuesa obtenidos por liofilización y secado spray, evaluando los compuestos bioactivos y propiedades fisicoquímicas, y analizar su aplicación como colorantes naturales en polvos para preparar bebidas analcohólicas.

2. Materiales y métodos

Preparación de las microcápsulas

Las frambuesas fueron adquiridas en comercios locales, de la zona de Luján, provincia de Buenos Aires. Para obtener el extracto las frutas se lavaron, deshojaron, escaldaron, trituraron y centrifugaron. El escaldado se realizó en microondas a potencia media hasta que la muestra alcanzó los 70 °C, la temperatura fue medida

colocando el termómetro en el centro de la muestra, previa agitación. Luego se centrifugó (SORVALL RC6+ Thermo Scientific, Alemania) a una velocidad de 12000 rpm, durante 20 minutos, a 10 ºC, obteniendo un jugo (extracto) y pulpa con bajo contenido acuoso. Posteriormente, el jugo se filtró por vacío eliminando las semillas y demás restos. Los pigmentos se encapsularon por liofilización (CFL) y secado spray (CFS), su formulación se resume en la Tabla 1. Se utilizó maltodextrina 20E (Globe 19150, Ingredion) como material de pared en todas las formulaciones, los sistemas CFL3 y CFL4 se aditivaron con sulfato de hierro (Anedra), sulfato de zinc (Biopack) y lactato de calcio (Adama), para mejorar el perfil nutricional del producto.

Tabla N°1: Formulación de las muestras CFS, CFL, CFL3 y CFL4 obtenidas con extracto de frambuesa (Ext. F), maltodextrina (M), sulfato de hierro (Fe), sulfato de zinc (zn) y lactato de calcio (Ca).

Muestra	Ext. F (g)	M (g)	Fe (g)	Zn (g)	Ca (g)	°Bx
CFS	100	27,5	-	-	-	29,8
CFL	100	27,5	-	-	-	29,8
CFL3	100	27,5	0,15	-	-	29,9
CFL4	100	27,5	0,15	0,127	15	29,9

Los ingredientes se mezclaron a temperatura ambiente, en agitadores magnéticos, hasta disolución total de todos los componentes. Se determinaron sólidos totales, expresados como ºBx en todas las formulaciones (Tabla 1).

El proceso de congelación se realizó a -18°C durante 48 horas. Previo a la liofilización, todas las muestras se colocaron durante dos horas en Ultra freezer a -80°C. Posteriormente se liofilizaron en un equipo LABCONCO FREEZONE 12, USA, estabilizado en los siguientes parámetros: Presión: menor a $17x10^{-3}$ MBAR, Temperatura: -54 °C, durante 72h. Por otro lado, se obtuvieron los sistemas por atomización en un secadero spray (SEI Ingeniería) proporcionado por el grupo de trabajo de Agroindustria (INTI Miguelete). Condiciones de secado spray: temperatura de entrada: 185°C, temperatura de salida: 85°C, caudal de alimentación: 9kg/h, temperatura de alimentación: 20°C. Los sistemas continuos liofilizados y secados spray se colocaron rápidamente en un desecador con Sílica gel para evitar su rehidratación.

Para analizar la cinética de deterioro, los sistemas fueron estabilizados a diferentes actividades de agua. Las muestras de aproximadamente 2 g se pesaron por triplicado en balanza analítica (Denver Instrument, USA; con precisión + 0,0001g), luego fueron colocadas en desecadores cerrados al vacío con humedades relativas constantes. Los desecadores se mantuvieron a temperatura ambiente 22° ± 1 °C, controlada diariamente. Se utilizaron las siguientes soluciones saturadas de sales: ClLi, $KC_2H_3O_2$, $MgCl_2$, NaBr, NaCl, que proporcionan actividades de agua: 0,11; 0,22; 0,32; 0,56 y 0,75, respectivamente. En cada desecador se ubicó un recipiente con la solución saturada correspondiente y las muestras, que se dejaron estabilizar durante 30 días, pesando sucesivamente hasta peso constante.

Cinética de deterioro

Para analizar la degradación de los compuestos bioactivos (antocianinas y fenoles totales) y la capacidad antioxidante de los sistemas deshidratados en el tiempo se utilizaron los modelos cinéticos de orden cero y orden uno. Se muestran a continuación la ecuación cinética general de orden *n* (ecuación 1), la correspondiente a una reacción de orden cero (ecuación 2) y de orden 1 (ecuación 3). A partir de los datos experimentales de concentración del compuesto activo en función del tiempo de almacenamiento se determinaron los órdenes de reacción y las constantes de velocidad de degradación.

$$\frac{dC}{} = - kC^n \qquad (1)$$

$$C = C_0 - kt \qquad (2)$$

$$C = C_0.e^{-kt} \Rightarrow \ln C = \ln C_0 - k.t \qquad (3)$$

Donde, C: la concentración del compuesto bioactivo en el tiempo t, C_0: la concentración del compuesto bioactivo al inicio del almacenamiento,
t: tiempo (días), k: constante de velocidad de degradación del compuesto expresado en ($días^{-1}$) y n: orden de la reacción.

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$): corresponde al tiempo necesario para que la concentración del compuesto descienda a la mitad su valor inicial. A partir de la ecuación 3 se calculó el tiempo de vida media, según la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln C_0 - \ln C_0/2}{k} = \frac{\ln 0,5}{k} = \frac{0,693}{k} \qquad (4)$$

Estas aproximaciones empíricas de modelos cinéticos basados en el concepto de orden de reacción (orden cero y uno) son adecuados para controlar y predecir cambios en los parámetros físico-químicos durante el almacenamiento (Remini *et al*., 2015). Además, el conocimiento de parámetros cinéticos como constante de velocidad de degradación y tiempo de vida media, aportan información relacionada a la estabilidad

de los compuestos bioactivos (Martynenko y Chen, 2016).

Preparación del polvo para preparar bebida analcohólica

Se formuló una base de polvo para preparar bebida analcohólica sabor cítrico, que responde a la normativa (CAA, capítulo XII, artículo 1009) e incluye: acidulante (ácido cítrico, Adama), antiaglutinante (fosfato tricálcico Elbahiense), reguladores de acidez (citrato de sodio, Inmobal Nutrer), edulcorantes no calóricos (glucósido de esteviol, Tate&Lile), aromatizantes (sabor limón y frutilla en polvo, Duas Rodas), y pigmento antociano encapsulado como colorante natural (Tabla 2).

Tabla N°2: Formulación base de polvo para preparar bebidas analcohólicas.

Ingrediente	Concentración (g/10 g de polvo)
Acidulante	5,6 – 5,8
Pigmento	3,00 – 3,05
Antiaglutinante	0,45 – 0,55
Aromatizante (limón – frutilla)	0,45 – 0,55
Regulador de acidez	0,25 – 0,35
Edulcorantes	0,40 – 0,45

Los ingredientes se mezclaron intensamente, logrando las siguientes formulaciones:

- **JF1:** polvo base formulado + CFS
- **JF2:** polvo base formulado + CFL
- **JF3:** polvo base formulado + CFL3
- **JF4:** polvo base formulado + CFL4

Las mezclas se fraccionaron en sobres de 6,61 g (para disolver en 250 mL de agua). En los polvos se cuantificó actividad de agua y color y en los jugos reconstituidos se determinó °Bx, pH, acidez titulable, color y actividad antioxidante. Los análisis se realizaron a: 0, 3, 6, 9 y 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, en envase similar a los polvos comerciales sellados con calor.

Ensayos fisicoquímicos

Sólidos totales

Los sólidos totales se determinaron por refractometría, expresados como ºBx, utilizando un refractómetro (HI96801 HANNA instruments, Romania).

Acidez titulable

Para determinar la acidez total titulable, se utilizó el método volumétrico según técnica AOAC 2939.05. El ensayo se realizó utilizando 10 mL de muestra. Los resultados se expresaron en gramos de ácido cítrico por cada 100 mL de muestra (1 mL de solución 0,1N de hidróxido de sodio equivale a 0.006404 g de ácido cítrico anhidro), según se indica en la ecuación 5:

$$\% A(p/v)=(V_{NaOH} x N_{NaOH} x f_{NaOH} x 0{,}006404)/V_m \, x100 \quad (5)$$

Donde, V_{NaOH} es el volumen gastado de la solución de hidróxido de sodio, N_{NaOH} es la normalidad de la solución de hidróxido de sodio, f_{NaOH} es el factor de corrección de la solución de hidróxido de sodio y V_m corresponde al volumen de la muestra.

Color

Para las mediciones de color se utilizó un colorímetro manual MiniScan EZ, HunterLab, USA, previamente calibrado. Se midieron los parámetros L*, a* y b* y se calculó ΔE (diferencia total de color), según la siguiente fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (6)$$

Actividad de agua

El ensayo se realizó con un medidor de a_w AquaLab, USA con exactitud ± 0,01 y rango de 0 a 1,00 a_w, a temperatura ambiente, según norma ISO 18787:2017.

Higroscopicidad

La higroscopicidad se evaluó colocando las muestras en un desecador con solución saturada de NaCl, generando una atmósfera con humedad relativa del 75% a 20°C, hasta alcanzar el equilibrio (Pereira Souza *et al*., 2016). Las muestras se retiraron periódicamente y se pesaron en balanza analítica (Denver Instrument, USA; con precisión + 0,0001g), hasta alcanzar peso constante. El aumento de peso como función del tiempo (adsorción de agua) se registró por triplicado y la higroscopicidad se expresó como el promedio de diez registros consecutivos correspondientes a la zona asintótica de la curva, en g de agua/100g de muestra.

Determinación de compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Cuantificación de antocianinas

La concentración de antocianinas se cuantificó mediante el método de pH diferencial, midiendo la absorbancia de la muestra diluida con soluciones buffer de cloruro de potasio a pH 1,0 y de acetato de sodio a pH 4,5 (Giusti y Wrolstad, 2001). Los resultados se expresaron como Cianidina-3-glucósido (glucósido que predomina en frambuesa), utilizando las siguientes fórmulas:

$$A=(A_{\lambda vis\text{-}max} - A_{700})_{\,pH\,1} - (A_{\lambda vis\text{-}max} - A_{700})_{\,pH\,4,5} \quad (7)$$

$$\text{Antocianinas(mg/l)}=(A \times PM \times DF \times 1000)/(£ \times 1) \quad (8)$$

Donde, A: absorbancia calculada previamente, DF: factor de dilución, PM: peso molecular, £: coeficiente de extinción y l: paso (1 cm). Para expresarlo en cianidina-3-glucósido se consideró: PM: 449,2 y £: 26900.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó por la técnica de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil), se midió el porcentaje de captación de radical libre DPPH por diferencia de absorbancia, desarrollado por Brand-Williams *et al*. (1995) y modificado por Kim *et al*. (2002). La reacción se monitoreó por espectrofotometría visible a 515 nm, a un tiempo estandarizado de 30 minutos, en un espectrómetro Shimadzu, UV-VISIBLE, modelo UV- 1800, Japón. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, según la siguiente fórmula:

$$CAO(\%I) = (A_0 - A_{30} / A_0) \times 100 \quad (9)$$

Donde, A_0 corresponde a la absorbancia del reactivo DPPH y A_{30} es la absorbancia de la muestra al reaccionar con el reactivo luego de 30 minutos.

Contenido de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu (F-C). Se mezclaron 30 µL de la muestra con 150 µL del reactivo de Folin diluido al 50 % v/v en agua, luego se añadió 125µL de Na_2CO_3 al 20%, rápidamente se agitó y se agregó 800 µl de agua bidestilada. Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min (Eppendorf AG 22331, Hamburg, Alemania) y se dejó en oscuridad por 40 minutos para permitir la reacción (Chuah *et al.,* 2008). Se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 765nm en un espectrómetro Shimadzu, UV-VISIBLE, modelo UV- 1800 (Japón). Previamente se realizó una de curva de calibración de ácido gálico en agua. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por 100 mL de muestra según la siguiente fórmula:

$$\text{mg ácido gálico/mL} = (\text{mg ac. Gálico/mL}) \times (\text{mL disolvente/mL de muestra}) \times 100 \quad (10)$$

Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Microscopia electrónica de Barrido (SEM) en muestras deshidratadas

La morfología de las partículas se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM), operado en el modo de alto vacío (Philips XL30). Se utilizó el equipamiento del Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, Argentina.

Análisis estadístico

Se realizó análisis de la varianza (ANOVA), para un nivel de significación (α) de 0,05. Se utilizó el programa InfoStat versión 2008. Los resultados de las mediciones se expresaron por su valor de media ± la desviación estándar (sd) de los triplicados. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism, versión 7 para el análisis de regresión, ajustar los modelos matemáticos y determinar los parámetros cinéticos.

3. Resultados y Discusión

Sistemas continuos obtenidos por liofilización y secado spray con extracto de frambuesa

Caracterización de las microcápsulas

Se compararon los sistemas obtenidos por dos técnicas de encapsulación, liofilización (CFL) y secado spray o pulverización (CFS). Se utilizó la misma formulación para ambas técnicas (extracto de frambuesa y maltodextrina, con 30°Bx finales), según se detalla en materiales y métodos.

En la Tabla 3 se muestran los valores correspondientes a las propiedades físico-químicas ensayadas para ambas muestras, al inicio del ensayo.

Tabla N°3: Propiedades físico-químicas de los encapsulados secados por atomización (CFS) y liofilizados (CFL) al inicio del ensayo.

Muestra	Higroscopicidad (g agua/100 g)	color		
		L*	a*	b*
CFS	19,6 ± 0,1 b	43,50 ± 0,72 b	48,47 ± 0,98 b	8,48 ± 0,79 a
CFL	13,9 ± 0,3 a	41,11 ± 0,45 a	40,28 ± 0,66 a	9,22 ± 0,71 b

En cada columna, las medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tantos los polvos microencapsulados por secado spray como los obtenidos por liofilización mostraron buenas propiedades físico-químicas. La higroscopicidad de los encapsulados presentó diferencias significativas entre los distintos sistemas debido a que la higroscopicidad está relacionada con su microestructura, la cual depende de la técnica de encapsulación. El secado spray genera polvos más finos, con partículas de

menor tamaño lo que se traduce en una incorporación de agua mayor. Los valores de higroscopicidad de las muestras liofilizadas, aunque resultaron menores, fueron lo suficientemente altos para garantizar la disolución de los polvos en las matrices alimentarias acuosas. En cuanto al color, los encapsulados presentaron una coloración rosa intensa, sin embargo, se notó una diferencia de tonalidad perceptible tanto en la luminosidad como en el parámetro cromático a*.

La Tabla 4 muestra el contenido de antocianinas, capacidad antioxidante y fenoles totales de ambos sistemas, se partió de un extracto de frambuesa caracterizado previamente con un contenido de antocianinas de 986 mg/Kg, 15,5 °Bx y pH 3,07. El polvo secado por pulverización presentó mayor contenido de antocianinas, capacidad antioxidante y fenoles totales.

Tabla N°4: Contenido de antocianinas, capacidad antioxidante (DPPH) y fenoles totales, para las muestras con extracto de frambuesa.

Muestra	Antocianinas (mg/kg m.s.)	DPPH (%I)	Fenoles Totales (mg ác. g./100g m.s.)
CFS	2099 ± 61 b	73 ± 1 b	441 ± 22 b
CFL	1820 ± 73 a	65 ± 3 a	399 ± 16 a

En cada columna, las medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Se observó diferencia significativa entre ambas muestras para las tres variables analizadas aplicando el Test de Tukey, esta variabilidad se debió a que el método de secado provoca diferencias en estructura y morfología de las partículas obtenidas por cada técnica, indicando que las partículas esféricas y más regulares obtenidas por secado spray, permitieron mejores propiedades fisicoquímicas y bioactivas. Los autores Ribeiro Santos Rezende *et al*. (2018) y Preetha (2017) estudiaron sistemas encapsulados por ambos métodos, concordando sus resultados con los obtenidos en nuestros ensayos. Si bien el secado por atomización implica una temperatura alta de proceso (60-90 °C en la superficie de la partícula), que podría afectar los compuestos de interés, al ser muy corto el tiempo de contacto entre el aire caliente y la muestra, la degradación del pigmento antociano y por ende su actividad antioxidante, no se vieron tan afectadas.

Cinética de deterioro en las microcápsulas

La cinética de deterioro del pigmento se estudió en los sistemas obtenidos por ambos métodos de secado y almacenando los sistemas a diferentes actividades de agua (0,11; 0,22; 0,32; 0,56 y 0,75) factor fijo. Se midió como variables respuesta el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Se siguió la degradación de los compuestos de interés a lo largo de 12 meses.

La Figura 1 muestra como varía la concentración de antocianinas, la capacidad antioxidante y fenoles totales, a lo largo de los 12 meses de análisis, en las diferentes condiciones de almacenamiento. Se ajustaron los valores de contenido de antocianinas por regresión lineal de orden uno, mientras que las curvas correspondientes a la actividad antioxidante (CAO) y fenoles totales (FT) se ajustaron al modelo matemático de Orden 0. Se usó el programa GraphPad, tomando como inicio de la cinética 30 días, que representa el tiempo de estabilización de los sistemas.

Se puede observar en la Figura 1 como influyó la actividad de agua en el deterioro del pigmento antociano, se apreció que para las dos condiciones de secado las actividades de agua más altas (a_w 0,56 y 0,75) mostraron un descenso significativo de los pigmentos a lo largo de todo el periodo analizado.

Por otro lado, se pudo observar que los fenoles totales no se correlacionan directamente con el deterioro del pigmento antociano. A humedades ambientes bajas (entre a_w 0,11 y 0,35) se observó una disminución de los FT menor al 10% para ambas muestras. En las peores condiciones de almacenamiento (a_w 0,75) los FT disminuyeron un 14 y 16 % para las muestras CFS y CFL, respectivamente. Con estos resultados se puede inferir que las frambuesas presentan otros compuestos fenólicos, además de las antocianinas, que no se degradan con la presencia de alta humedad ambiente y son estables en el tiempo. Sin embargo, en los últimos años algunos autores han estudiado los compuestos de degradación de los pigmentos antocianos, dentro de los cuales se destacan el ácido protocatechuico, el ácido clorogénico y el ácido cafeico, que son compuestos fenólicos (Sinela *et al*., 2017; Achir *et al*., 2019). En este trabajo, se atribuyó a los mencionados productos de degradación de las antocianinas, la alta estabilidad de los fenoles totales en el tiempo y en condiciones ambientales adversas.

El comportamiento de los diferentes sistemas en cuanto a la capacidad antioxidante resultó similar a lo indicado en concentración de antocianinas y fenoles totales a humedades ambientes bajas. Los resultados iniciales fueron diferentes para los dos métodos de encapsulación, los valores de los sistemas secados spray resultaron superiores a los liofilizados. Las dos muestras presentaron una

disminución de la capacidad antioxidante menor al 15% en las actividades de agua más bajas (0,11; 0,22 y 0,35), mientras que a a_w 0,75 a los 12 meses disminuyó un 57 y 52% para las muestras CFS y CFL respectivamente.

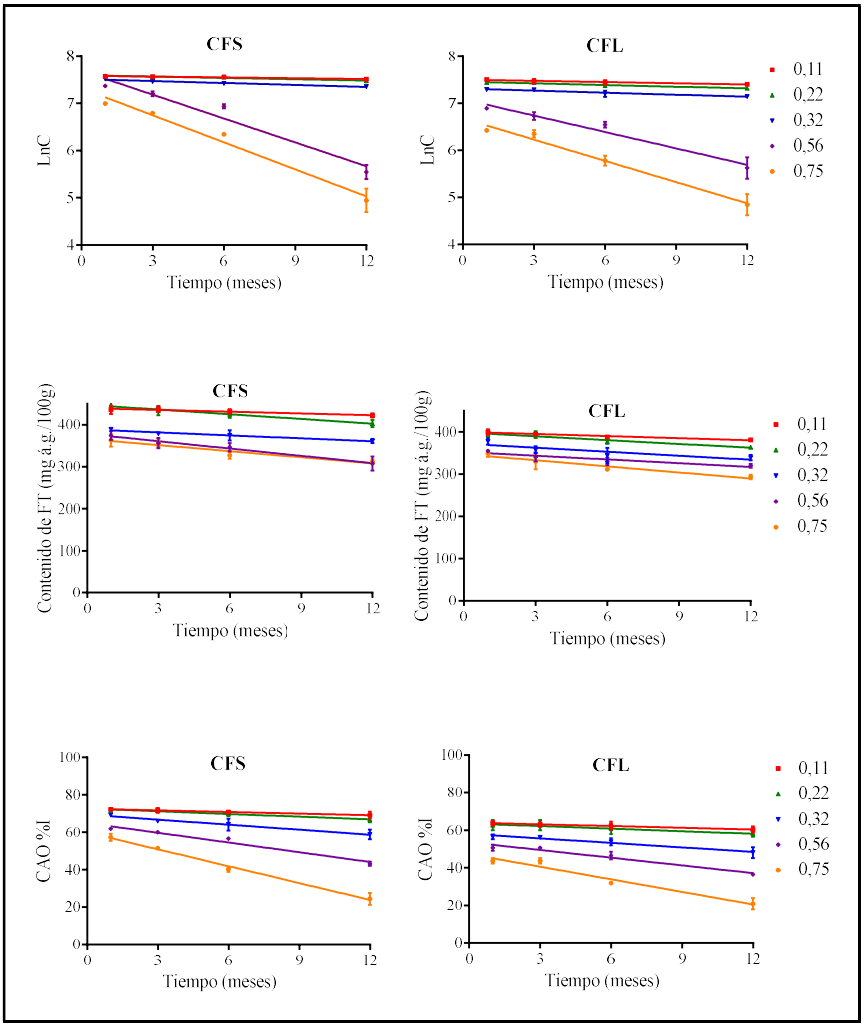


Figura 1: Cinética de deterioro del pigmento antociano (C, orden 1), capacidad antioxidante (CAO, orden 0) y fenoles totales (FT, orden 0), en los encapsulados de extracto de frambuesa obtenidos por secado spray (CFS) y liofilización (CFL) almacenadas durante 12 meses a diferentes actividades de agua.

En la Tabla 5 se indican los parámetros cinéticos obtenidos para ambas muestras (CFS y CFL) en lo que refiere a degradación del pigmento antociano, a las diferentes a_w analizadas durante 12 meses.

Mediante secado spray se logró una mejor estabilización de los pigmentos encapsulados en condiciones de humedad ambiente baja (a_w entre 0,11 y 0,32). Se observó una marcada diferencia en los tiempos de vida media entre los dos métodos de secado, que se puede asociar al mayor poder cubritivo de la fase maltodextrina en los polvos deshidratados por secado spray. En cambio, a humedades ambientales altas el tamaño de partícula afecta notoriamente, no solo la absorción de humedad sino la pérdida de pigmento asociada, lo que se traduce en menores tiempos de vida útil a tamaño de partícula menor.

Tabla N°5: Parámetros cinéticos de degradación del pigmento antociano en los encapsulados obtenidos por secado spray (CFS) y por liofilización (CFL) a las distintas condiciones analizadas, ajustado al modelo matemático de orden 1.

Muestra	a_w	K (días^{-1})	$T_{1/2}$ (días)	R^2	%D
CFS	0,11	-0,000188	3674	0,967	6 a
CFS	0,22	-0,000305	2268	0,926	10 b
CFS	0,32	-0,000468	1480	0,970	15 c

CFS	0,56	-0,005621	123	0,949	84 e
CFS	0,75	-0,006368	109	0,978	87 f
CFL	0,11	-0,000281	2464	0,941	9 b
CFL	0,22	-0,000400	1729	0,921	11 b
CFL	0,32	-0,000483	1432	0,933	14 c
CFL	0,56	-0,003873	179	0,964	71 d
CFL	0,75	-0,005016	138	0,983	79 e

K: -pendiente
$T_{½}$: tiempo de vida media
R^2: coeficiente
%D: porcentaje de antocianina degradada en el tiempo 340 días
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Al comparar ambos métodos de secado, se encontró en la bibliografía varios puntos de vista diferentes, debido a que depende de muchos factores, como el método y condiciones de microencapsulación, material portador y su concentración. Los resultados obtenidos en el tratamiento de secado por pulverización presentaron el mejor perfil debido a la retención de altas concentraciones de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante, que se relacionan con su bajo contenido de humedad, a_w, higroscopicidad, tamaño de partícula y a sus características morfológicas de micropartículas esféricas, que tienen menor aparición de asperezas y fisuras que las partículas liofilizadas, resultados que concuerdan con lo señalado por los autores Ribeiro Santos Rezende *et al*. (2018) en su estudio en pulpas de acerola. Por otra parte, Saikia *et al*. (2015) estudiaron los compuestos fenólicos en microencapsulados de orujo de *Carambola averrhoa* por pulverización y liofilización, e informaron que los valores de FT de los encapsulados secados por pulverización resultaron mayores a los sistemas liofilizados.

Color

El color característico de las frambuesas es rosa intenso y muy atractivo. En la Tabla 6 se indican los parámetros de color L, a* y b* para las dos muestras con extracto de frambuesa (CFS y CFL) en las condiciones de actividad de agua estudiadas (0,11; 0,22; 0,32; 0,56 y 0,75), determinados al tiempo de estabilización, en las condiciones ambientales (1 mes) y al finalizar el ensayo (12 meses).

Al analizar el comportamiento de los parámetros cromáticos al primer mes de almacenamiento, las muestras sostenidas a las actividades de agua 0,11; 0,22 y 0,32 no mostraron diferencia significativa, considerando los diferentes sistemas de encapsulación (CFS y CFL). Sin embargo, las muestras almacenadas a actividades de agua altas (0,56 y 0,75) el efecto de la humedad medioambiental resultó notable, tanto al tiempo de estabilización como a los 12 meses de almacenamiento.

Tabla N°6: Parámetros cromáticos L, a* y b* para las microcápsulas obtenidas por secado spray (CFS) y liofilizadas (CFL), a las diferentes a_w, al tiempo de estabilización (1 mes) y al finalizar el ensayo (12 meses).

			a_w				
Muestra	Parámetro de color	Tiempo (mes)	0,11	0,22	0,32	0,56	0,75
CFS	L*	1	42,59 ± 0,68d	41,99 ± 1,04d	41,49 ± 0,65d	28,57 ± 1,47c	22,48 ± 1,71ab
CFL	L*	1	40,21 ± 0,24d	40,26 ± 0,42d	40,84 ± 0,86d	23,20 ± 0,42ab	25,08 ± 1,52bc
CFS	L*	12	42,02 ± 0,75d	42,64 ± 0,74d	42,27 ± 0,82d	25,33 ± 0,82bc	20,28 ± 0,53a
CFL	L	12	40,46 ± 1,71d	40,27 ± 0,81d	41,26 ± 1,36d	26,19 ± 2,44bc	22,92 ± 1,88ab
CFS	a*	1	46,89 ± 0,68g	46,22 ± 0,73g	45,98 ± 2,04g	31,7 ± 1,88e	16,93 ± 2,97d
CFL	a*	1	39,49 ± 0,38f	39,36 ± 0,25f	39,55 ± 0,90f	16,57 ± 0,71d	14,45 ± 1,11cd
CFS	a*	12	46,65 ± 0,17g	45,75 ± 0,78g	45,48 ± 0,88g	16,61 ± 2,63d	4,40 ± 0,34a
CFL	a*	12	38,95 ± 2,00f	39,92 ± 1,49f	38,39 ± 0,78f	10,01 ± 1,42bc	8,84 ± 2,88ab
CFS	b*	1	8,32 ± 0,11def	8,20 ± 0,55cde	8,48 ± 0,26def	6,01 ± 2,37bc	5,48 ± 1,42bc
CFL	b*	1	10,22 ± 0,21ef	9,99 ± 0,48ef	10,09 ± 0,21ef	5,34 ± 0,34b	4,51 ± 0,55b
CFS	b*	12	8,57 ± 0,12def	8,36 ± 0,01def	8,34 ± 0,34def	6,51 ± 0,46bcd	1,46 ± 0,54a
CFL	b*	12	10,32 ± 0,56ef	10,98 ± 1,03f	10,56 ± 0,48ef	4,17 ± 0,63ab	4,24 ± 2,25b

En cada fila, las medias con una letra común (para cada parámetro cromático) no son significativamente diferentes (p>0,05).

Las muestras fueron analizadas mediante el Test de Tukey con α=0,05. En la Figura 2 se pueden apreciar los colores de las muestras CFL y CFS para cada condición. Al adsorber agua del ambiente, los polvos se tornaron más oscuros, disminuyendo significativamente tanto la luminosidad L como los parámetros a* y b*.

Microestructura de las cápsulas

La microestructura de las cápsulas obtenidas por liofilización y por atomización son claramente distintivas, las propiedades físico-químicas y contenido de los compuestos bioactivos está estrechamente relacionado con estas propiedades. En los estudios previos se mostró que la actividad de agua tiene gran influencia sobre ambas muestras, a medida que aumenta la a_w del sistema, se hicieron más notables los cambios de color y

aspecto (Figura 2). Inicialmente se presentaron como un polvo color rosa intenso sin contracción ni aglomeración de sus partículas, manteniendo estas características en las a_w: 0,11, 0,22 y 0,32. A a_w 0,56 comenzaron a observarse fenómenos de colapso acompañado de cambio de características cromáticas. En la condición de mayor actividad de agua (0,75) se apreció mayor contracción y aspecto blando y gomoso.

Figura N°2: Imagen de las muestras liofilizadas (CFL) y secadas spray (CFS) con extracto de frambuesa, equilibradas a diferentes a_w (0,11; 0,22; 0,32; 0,56 y 0,75), a los 12 meses de análisis.

Las fotos obtenidas con lupa (10X) mostraron diferencias en la superficie de los polvos (Figura 3 A y B). A condiciones de humedad normal (alrededor 60%) se observó la influencia del proceso de deshidratación en los fenómenos de absorción de agua superficial, el brillo de las gotas de agua evidencia el efecto de la estructura.

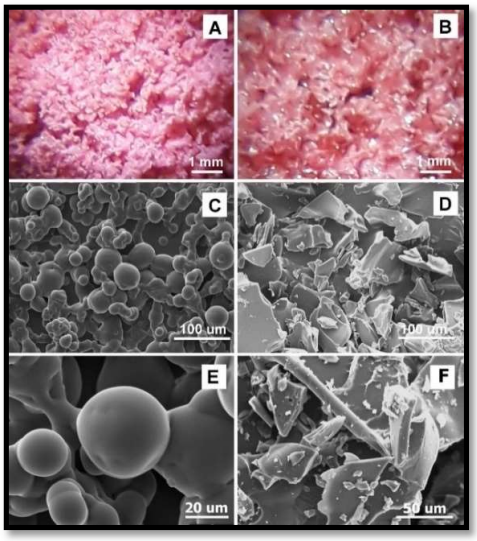


Figura N°3: Imagen de las muestras con extracto de frambuesas secadas por liofilización (derecha) y por atomización (izquierda), foto obtenidas con lupa 10X (A y B) y por Microscopia Electrónica de barrido (C, D, E y F).

La morfología de las partículas secadas por spray, observadas en el microscopio electrónico de barrido, presentaron forma esférica y paredes lisas (Figura 3 C y E), estudiadas por los autores Tonon *et al*. (2008); Caparino *et al*. (2012); Arrazola *et al*. (2013). Mientras que los productos liofilizados (Figura 3 D y F) mostraron láminas/hojuelas porosas, de forma y tamaño irregular, características de este tipo de secado (Ribeiro Santos Rezende *et al*., 2018; Kuck y Norena, 2016).

Aplicación de sistemas continuos liofilizados y por secado spray con extracto de frambuesa en polvos para preparar bebidas analcohólicas

Debido a la estabilidad del pigmento antociano liofilizado y secado spray a bajas actividades de agua y bajo pH, se pensó en introducir los sistemas continuos deshidratados en matrices de polvo para preparar bebidas analcohólicas. Se formuló un polvo para preparar bebida no alcohólica y se utilizó como colorante el pigmento encapsulado. Se destacó el perfil natural de este producto, el cual presentó edulcorante no calórico (estevia), encapsulados de pigmentos antocianos como colorante natural y se incorporaron hierro, zinc y calcio para mejorar las características nutricionales del producto, asimismo se mantuvieron los ingredientes indispensables que conservaron la naturaleza del producto. En la matriz base se incorporaron cuatro encapsulados diferentes: **JF1:** polvo base formulada + color (CFS), **JF2:** polvo base formulada + color (CFL), **JF3:** polvo base formulada + color fortificado (CFL3) y **JF4:** polvo base formulada + color fortificado (CFL4).

En la Tabla 7 se muestran los parámetros físico-químicos analizados al inicio (tiempo 0) y al final del ensayo (12 meses), la actividad de agua y color de las muestras de jugo en polvo.

Tabla N°7: Propiedades físico-químicas de los polvos para preparar bebidas analcohólicas con encapsulados secados spray (JF1) y liofilizados (JF2, JF3 y JF4) con extracto de frambuesa, a 0 y 12 meses de almacenamiento.

Muestra	Tiempo (meses)	a_w	Color			
			L*	a*	b*	ΔE
JF1	0	0,36 ± 0,02d	53,54 ± 0,20a	39,13 ± 0,33g	5,27 ± 0,45e	3,45 ± 0,20b
	12	0,33 ± 0,01c	54,06 ± 0,21ab	35,78 ± 0,30f	4,65 ± 0,22d	
JF2	0	0,31 ± 0,01b	54,99 ± 0,22b	27,90 ± 0,28e	4,29 ± 0,43cd	2,43 ± 0,16a
	12	0,35 ± 0,02d	57,41 ± 0,23c	28,10 ± 0,21e	4,18 ± 0,38c	
JF3	0	0,31 ± 0,01c	54,99 ± 0,22b	23,02 ± 0,42c	3,05 ± 0,25b	3,09 ± 0,18b

	12	0,35 ± 0,01d	54,06 ± 0,21ab	25,94 ± 0,25d	2,64 ± 0,41a	
JF4	0	0,26 ± 0,02a	60,44 ± 0,19d	19,99 ± 0,12a	3,33 ± 0,32b	2,13 ± 0,20a
	12	0,38 ± 0,01e	61,90 ± 0,20de	20,97 ± 0,14b	2,13 ± 0,21a	

En cada columna, las medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Por otro lado, en la Tabla 8 se resumen los valores de pH, °Bx, acidez (expresado en g de ácido cítrico/100 g de muestra), color y actividad antioxidante (expresado como %I determinado por la técnica de DPPH), para las muestras de jugo reconstituido en agua.

Tabla N°8: Propiedades físico-químicas y capacidad antioxidante de los polvos reconstituidos con encapsulados secados spray (JF1) y liofilizados (JF2, JF3 y JF4) con extracto de frambuesa, a 0 y 12 meses de almacenamiento.

Muestra	Tiempo (meses)	pH	°Bx	Acidez (%p/v)	Color				CAO (%I)
					L*	a*	b*	ΔE	
JF1	0	3,07± 0,02 b	1,0 ± 0,2 a	0,58 ± 0,05 a	76,27 ± 0,43 a	12,64 ± 0,32 e	-8,90 ± 0,25 a	8,73 ± 0,35 c	21 ± 1cd
	12	2,90 ± 0,01 a	1,0 ± 0,2 a	0,59 ± 0,05 ab	77,65 ± 0,34 b	8,98 ± 0,29 cd	-1,10 ± 0,20 e		20 ± 1c
JF2	0	3,06 ± 0,02 b	1,0 ± 0,2 a	0,57 ± 0,05 a	76,38 ± 0,26 a	9,41 ± 0,20 d	-7,60 ± 0,27 b	6,69 ± 0,42 a	15 ± 2a
	12	2,90 ± 0,03 a	1,0 ± 0,2 a	0,56 ± 0,05 a	77,90 ± 0,65 b	7,70 ± 0,27 bc	-1,31 ± 0,19 de		15 ± 1a
JF3	0	3,08 ± 0,02 b	1,0 ± 0,2 a	0,61 ± 0,05 ab	76,21 ± 0,23 a	10,06 ± 0,31 d	-7,63 ± 0,29 b	6,83 ± 0,27 a	22 ± 2cd
	12	2,89 ± 0,02 a	1,0 ± 0,2 a	0,59 ± 0,05 ab	77,68 ± 0,30 b	7,68 ± 0,35 bc	-1,40 ± 0,21 d		19 ± 2b
JF4	0	3,22 ± 0,03 c	1,1 ± 0,2 a	0,58 ± 0,05 a	78,72 ± 0,43 c	7,28 ± 0,25 b	-9,07 ± 0,33 a	7,77 ± 0,35 b	30 ± 1e
	12	3,10 ± 0,01 b	1,1 ± 0,2 a	0,59 ± 0,05 a	78,81 ± 0,32 c	4,78 ± 0,30 a	-1,71 ± 0,25 c		26 ± 1d

En cada columna, las medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

En todos los polvos se observó que la actividad de agua no superó el valor de 0,38 (a_w del jugo comercial medido en el ensayo anterior), lo que afirmó la buena elección del material de empaque y condiciones de almacenamiento. Si bien el color de algunos de los polvos mostró diferencia significativa entre el inicio y el final del ensayo, estas se consideraron aceptables en este estudio. Así mismo, la diferencia de color ΔE resultó inferior a 4, lo que indicó un cambio de coloración mínimo a lo largo de la vida útil.

En los jugos reconstituidos no se apreciaron diferencias significativas en los valores de sólidos totales a lo largo del almacenamiento. Los valores de acidez titulable y pH presentaron leves diferencias, pero las mismas no influyeron en sus características organolépticas. En lo que se refiere al color de los polvos reconstituidos, al igual que en los polvos con base comercial, se observaron diferencias apreciables en los parámetros cromáticos a* y b* entre las muestras y en los tiempos estudiados. Los valores de ΔE superaron en todos los casos las 6 unidades, destacando en la muestra JF1 la mayor diferencia de color, que se puede apreciar en la Figura 4, donde se observan los jugos en polvo y reconstituidos, al inicio y al final del ensayo. El agregado de minerales modificó sustancialmente la coloración de los polvos, la presencia de hierro en la formulación JF3 intensificó el color rojo, mientras que el agregado de calcio en alta concentración aclaró la mezcla y disminuyó su tonalidad roja. Los distintos sistemas presentaron valores diferentes de capacidad antioxidante (Tabla 8), resultando la muestra JF4 la formulación óptima en este sentido, debido a la presencia de lactato de calcio en su formulación, el cual exhibe actividad antioxidante. Las formulaciones JF1, JF2 y JF3 no arrojaron diferencias significativas entre el inicio y el final del ensayo, lo cual indicó que la matriz se mantuvo estable durante el almacenamiento. La muestra JF4 mostró una diferencia significativa durante la vida útil estudiada, lo cual pudo deberse a los diferentes componentes presentes en la formulación.

Figura N°4: Polvos para preparar bebidas analcohólicas y muestras reconstituidas con encapsulados con extracto de frambuesa secados spray (JF1) y liofilizados (JF2, JF3 y JF4), a 0 y 12 meses de almacenamiento.

El sistema en polvo presentó buena estabilidad durante la vida útil analizada, no se observó apelmazamiento y presentó buena disolución en agua. El color resultó atractivo y si bien mostró

cambios significativos al inicio y al final del ensayo, no reflejó un cambio notorio del producto, se mantuvo dentro de los parámetros esperados. El agregado de pigmento antociano proporcionó actividad antioxidante, con sus consecuentes beneficios en la salud humana.

4. Conclusiones

Se pudieron comparar dos tecnologías de encapsulación, la liofilización y el secado spray, logrando una alta protección de los compuestos bioactivos presentes en las frutas por ambos métodos. Si se deseara alcanzar la producción a escala industrial, el secado spray es la mejor alternativa, tanto por el volumen de producción como por su costo. Se observó que la actividad de agua afectó la estabilidad de los encapsulados, estableciendo como condiciones óptimas de almacenamiento actividad de agua entre 0,22 y 0,32. La herramienta de microscopía electrónica permitió estudiar la microestructura de las cápsulas y comprender los fenómenos de absorción de agua.

La incorporación de los sistemas deshidratados con pigmentos antocianos provenientes de frambuesa, en polvos para preparar bebidas analcohólicas, mostró resultados satisfactorios, ya que presentaron buena estabilidad durante los 12 meses de estudio, no se observó apelmazamiento y permitieron una buena disolución en agua. El pigmento antociano mostró un excelente poder tintóreo y proporcionó actividad antioxidante que se mantuvo en valores aceptables durante su vida útil.

Los diferentes sistemas deshidratados con pigmentos antocianos se constituyen en una excelente alternativa al reemplazo de colorantes y antioxidantes sintéticos. La encapsulación ha mostrado su ventajosa utilización, brindando protección a compuestos lábiles, de alto poder antioxidante. Con los resultados obtenidos se espera contribuir al desarrollo de ingredientes para la incorporación en numerosas matrices alimentarias, abriendo posibilidades de revalorización de pigmentos naturales con propiedades benéficas para la salud.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad Nacional de Luján y la colaboración del Lic. Gustavo Reich, INTI Agroalimentos.

6. Referencias

Achir, N., Sinelab, A., Mertza,C., Fulcrandd, H., Dorniera, M. (2019). *Monitoring anthocyanin degradation in Hibiscus sabdariffa extracts with multi-curve resolution on spectral measurement during storage.* Food Chemistry, 271: 536–542.

Amr, A. y Al-Tamimi, E. (2007). *Stability of the crude extracts of Ranunculus asiaticus anthocyanins and their use as food colourants*. International Journal of Food Science and Technology, 42: 985−991.

Arrazola, G., Herazo, I., Alvis, A. (2013). *Obtención y evaluación de la estabilidad de antocianinas de berenjena (Solanum melongena L.) en bebidas*. Información Tecnológica, 25(3): 43-52.

Barbosa-Canovas, G.V. y Vega-Mercado, H. (1996). *Dehydration of foods.* Chapman & Hall, New York, USA.

Bateman, B., Warner, J.O., Hutchinson, E. (2004). *The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children.* Archives of Disease in Childhood, 89: 506-511.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evalate antioxidant activity.* Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 22: 25-30.

Bridgers, E.N., Chinn, M.S., Truong, V.D. (2010). *Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweet potatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars.* Industrial Crops and Product, 32: 613–620.

Caparino, O., Tang, J., Nindo, C., Sablani, S., Powers, J., Fellman, J. (2012). *Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao' var.) powder*. Journal of Food Engineering, 111: 135–148.

Chuah, A.M., Lee, Y.C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.J., Ymatoba, T. (2008). *Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers.* Food Chemistry, 111: 20-28.

Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O. (2010). *Fennema Química de los alimentos*. 3ra. Edición. Editorial Acribia S.A.

Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., Martino, M.N. (2008). *Encapsulation of Natural Antioxidants Extracted from Ilex Paraguariensis.* Carbohydrate Polymers, 71: 126–134.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview*. Food Research International, 40(9): 1107-1121.

Giusti, M. M. y Wrolstad, R. E. (2001). *Characterization and Measurement of Anthocyanins*

by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 00: 1-13.

Kim, D-O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2002). *Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3713-3717.

Kuck, L.S., y Norena, C.P.Z. (2016). *Microencapsulation of grape (Vitis labrusca var. Bordo) skin phenolic extract using gum arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents*. Food Chemistry, 194: 569–576.

Li, R.H. (2013). *Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet*. Advances in Nutrition, 4(3): 384S–392S.

Lopez-Quiroga, E., Prosapio, V., Fryer, P.J., Norton, I.T., Bakalis, S. (2019). *A model-based study of rehydration kinetics in freeze-dried tomatoes*. Energy Procedia, 161: 75-82.

Martynenko, A. y Chen, Y. (2016). *Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing*. Journal of Food Engineering, 171: 44-51.

Messaoud, G.B., Sánchez-González, L., Probst, L., Desobry, S. (2016). *Influence of internal composition on physicochemical properties of alginate aqueous-core capsules*. Journal of Colloid and Interface Science 469: 120–128.

Parra Huertas, R.A. (2010). *Revisión: Microencapsulación de Alimentos*. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 63(2): 5669-5684.

Pereira Souza, A.C., Gurak, P.D., Ferreira Marczak, L.D. (2017). *Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace.* Food and Bioproducts Processing, 102: 186-194.

Poshadri, A. y Kuna, A. (2010). *Microencapsulation technology: A review*. The journal of Research Acharya N.G. Ranga Agricultural University, 38 (1): 86-102.

Prado-Lobato, S.C., Hernández-Castillo, M., Mogica-del Ángel, M., Moreno-Miranda, R., Preciado-Márquez, F. (2012). *Incidencia de hipersensibilidad a colorantes artificiales de los alimentos en un grupo de estudiantes de medicina.* Pediatría de México, 14(4): 172-175.

Preetha, R. (2017). *Comparison of Freeze Drying and Spray Drying for the Production of Anthrocyanin Encapsulated Powder from Jamun (Syzygium cumini).* Asian Journal of Chemistry, 29(6): 1179-1181.

Ratti, C. (2001). *Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review*. Journal of Food Engineering, 49: 311-319.

Remini, H, Mertz Ch, Belbahi, A, Achir, N., Dornier, M., Madani, K. (2015). *Degradation kinetic modelling of ascorbic acid and colour intensity in pasteurised blood orange juice during storage*. Food Chemitry, 173: 665–673.

Ribeiro Santos Rezende, Y.R., Pedreira Nogueira, J., Narain, N. (2018). *Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (Malpighia emarginata DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization.* Food Chemistry, 254: 281–291.

Sagalowicz, L., Leser, M., Watzke, H., Michel, M. (2006). *Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles.* Trends in Food Science & Technology, 17: 204-214.

Saikia, S., Mahnot, N. K., Mahanta, C. L. (2015). *Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying*. Food Chemistry, 171: 144–152.

Sinela, A., Rawat N., Mertz C., Achir, N., Fulcrand H., Dornier, M. (2017). *Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products.* Food Chemistry, 214: 234–241.

Sousdale, M., Baesso, M.L., Medina Neto, A., Nogueria, A.C., Marcolino, V.A., Metioli, G., (2013). *Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 955-965.

Strack, D. y Wray, V. (1994). *The anthocyanins In: The Flavonoids. J B Harborne (ed)*. Chapman & Hall. London, UK. pp: 1-22.

Tonon, R., Brabet, C., Hubinger, M. (2008). *Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (Euterpe oleraceae Mart.) powder produced by spray drying.* Journal of Food Engineering, 88: 411–418

Vilena, M., Morales, H., Gallardo, L., Ruiz M. (2009). *Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos*. Ars Pharmaceutica, 50: 43-50. 2009.

41TCA - Inclusión de nanopartículas de plata en soportes de quitosano

Inclusion of silver nanoparticles in chitosan supports

Diego A. Marín-Silva[1, 4], Nelson Romano[1], Leda Giannuzzi[1, 2], Adriana Pinotti[1, 3]

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CONICET- UNLP – CIC PBA)
2. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
3. Facultad de Ingeniería, UNLP, (1900) La Plata, Argentina
4. E-mail: dm.alejandrosilva@live.com

Resumen

Se diseñaron películas de quitosano (Q) funcionalizadas con nanopartículas de plata en diferentes proporciones Q/Ag (p/p) con capacidad antimicrobiana. Las NpAg se caracterizaron por espectrofotometría UV-Visible observándose el pico inherente cercano a 425 nm. Asimismo, las películas se caracterizaron por su solubilidad, WVP, TGA, SEM-EDS, DRX, ATR-FTIR y ángulo de contacto (CA). También se evaluó la capacidad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos como E. coli, S. aureus y Salmonella spp. Las micrografías de SEM-EDS mostraron que las nanopartículas de NpAg estaban bien dispersas en la matriz de Q. Según los resultados de ATR-FT-IR, las interacciones entre las nanopartículas de NpAg y los grupos funcionales Q se pudieron visualizar por cambios en la zona de los grupos amino e hidroxilo. Con respecto al ángulo de contacto (AC) se evidenció que con el aumento progresivo de concentración de NpAg las matrices nanocompuestas se tornaron más hidrofóbicas. Estos resultados explicarían los cambios evidenciados en la solubilidad de las matrices debido a interacciones establecidas entre el Q y las NpAg. La inclusión de nanopartículas de plata en matrices biopoliméricos permitiría obtener materiales más hidrofóbicas y con mayor resistencia. Asimismo, el efecto bactericida sobre Salmonella, S. aureus y E. coli arrojó resultados promisorios para su implementación como materiales antimicrobianos.

Palabras clave: Nanopartículas de plata (NpAg), quitosano, matrices biodegradables, capacidad antimicrobiana

Abstract

Chitosan (Q) films functionalized with silver nanoparticles with antimicrobial capacity in different Q/ Ag ratios (w/ w) were designed. The NpAg were characterized by spectrophotometry UV-Vis observing a typical peak close to 425 nm. Likewise, films were characterized by solubility, WVP, TGA, SEM-EDS, DRX, ATR-FT-IR, and contact angle (CA). The antimicrobial capacity against pathogenic microorganisms such as E. coli, S. aureus, and Salmonella spp. was also evaluated. The SEM-EDS micrographs showed that NpAg nanoparticles were well dispersed in the Q matrix. According to the ATR-FTIR results, the interactions between the NpAg nanoparticles and the Q functional groups were confirmed by changes in the amine and hydroxyl group windows. Regarding the contact angle (AC), with the progressive increase in the NpAg concentration, the nanocomposite matrices became more hydrophobic. These results would explain the changes evidenced in the solubility of the matrices due to the interactions established between Q and NpAg. The inclusion of silver nanoparticles in biopolymeric matrices would allow obtaining more hydrophobic materials with greater resistance. Likewise, the bactericidal effect on Salmonella, S. aureus, and E. coli yielded promising results for their implementation as antimicrobial materials.

Keywords: Silver nanoparticles (NpAg), chitosan, biodegradable matrices, antimicrobial capacity.

1. Introducción

Dentro de las nanopartículas metálicas, las nanopartículas de plata (NpAg) han sido objeto de numerosos estudios en el marco de la investigación de materiales antimicrobianos. Las NpAg han demostrado tener una versátil capacidad de solucionar problemas relacionados con la salud e higiene, debido principalmente a las propiedades

antimicrobianas siendo esta aplicación la más explorada.

Las NpAg tienen mayor aplicación comercial que otras nanopartículas como las de oro (Faried y Shameli, 2016; Wei y col., 2015). Este hecho se debe a sus múltiples aplicaciones, como el diseño de biosensores (Ahamed y col., 2010), la producción de materiales en control ambiental (Hussain y col., 2011) y en catálisis.

El tamaño, la estructura y las propiedades físicas, químicas y biológicas de las NpAg dependen del método de síntesis (Nair y Laurencin, 2007), existiendo una gran variedad de formas de obtención.

En vista de que los métodos convencionales para la síntesis de NpAg emplean reactivos tóxicos y no amigables con el medio ambiente, se han generado nuevas estrategias para la obtención de NpAg, siendo la síntesis verde un campo a desarrollar.

La síntesis verde es el proceso físico-químico que se realiza para la obtención de NpAg usando una serie de metodologías en las cuales el producto final posee características eco-compatibles sin el empleo de agentes reductores tóxicos (Wei y col., 2015). En estos procesos se usan agentes bioreductores y estabilizantes como consorcios microbianos, extractos de origen fitoquímico y micológico, biomasa vegetal, péptidos, proteínas y polímeros biodegradables (Alves y col., 2019; Ramanathan y Gopinath, 2017).

Es frecuente que para la estabilización de las cargas sea necesario agregar agentes estabilizantes en la síntesis de NpAg usando extractos biológicos. Una alternativa es el uso de polímeros sintéticos y/o naturales; dentro de estos se puede mencionar-el policloruro de vinilo (PVC), el alcohol polivinílico (PVA), la polivinilpirrolidona (PVP) y la policaprolactona. El uso de estos polímeros sintéticos en la obtención de NpAg permite que las partículas generadas puedan ser empleadas en aplicaciones biomédicas (Alavi y Rai, 2019; Dhote y col., 2018; Rolim y col., 2019; Tamayo y col., 2018). Biopolímeros como la celulosa, quitosano, alginato de sodio, ácido poliláctico (PLA) y colágeno son abundantes en la naturaleza, poseen alta biocompatibilidad y biodegradabilidad (Alavi y Rai, 2019; Hu y col., 2019). El quitosano (Q) es un polisacárido lineal, bioactivo y biocompatible, propiedades que han permitido numerosas aplicaciones farmacológicas, cosméticas y biotecnológicas (Marín-Silva y col., 2019).

El uso de quitosano permite obtener materiales activos debido a sus propiedades filmogénicas y bactericidas generando efectos sinérgicos. Las reacciones se llevan a cabo *in situ* y los grupos funcionales del quitosano como alcoholes tienden a oxidarse en el proceso siendo estos los agentes reductores (Muñoz-Bonilla y col., 2019; Venkatesham y col., 2012). Existen diferentes metodologías en la obtención de NpAg a partir de de quitosano, desde el uso de altas condiciones de presión y temperatura por medio de autoclave (Muñoz-Bonilla y col., 2019; Wong y col., 2020), hasta la simple incubación a altas temperaturas (100°C) de la mezcla de quitosano con la solución de $AgNO_3$.

Varios investigadores como Regiel y col. (2013) y Youssef y col. (2015) han formulado matrices de Q con el agregado de NpAg. Estas películas activas resultaron eficientes para la reducción de microorganismos como *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhamrium*, *B. cereus* y *Listeria monocytogenes*. Además se observaron cambios en las propiedades estructurales de las matrices con el aumento del agregado NpAg, mejoraron las propiedades mecánicas y se redujo su solubilidad.

Los objetivos fueron: i) sintetizar nanopartículas de plata en una solución de quitosano, ii) formular nanocompuestos incorporando distintas proporciones de nanopartículas a soluciones filmogénicas, iii) estudiar las propiedades estructurales, térmicas y antimicrobianas de los nanocompuestos.

2. Materiales y métodos

Síntesis de nanopartículas de plata

Para las síntesis de las nanopartículas (NpAg), nitrato de plata se solubilizó en una solución de Q 1% hasta alcanzar una concentración 30 mM. La solución se llevó a estufa a 95°C dando lugar a distintas relaciones $Q:Ag_X$ (Tabla 1.). Las propiedades ópticas de las nanopartículas se determinaron por medio de un espectrofotómetro DU 650 Beckman.

Tabla 1. Formulación de las suspensiones expresando la concentración de NpAg en g/ 100 g de Q (p/p) y en g/ 100 ml de solución de quitosano 1% (p/v)

Formulación	Concentración de NpAg % (p/p_Q)	Concentración de NpAg % (p/v)
Q	0	0
QAg_1	2.91	0.029
QAg_2	5.33	0.053
QAg_3	7.38	0.074
QAg_4	9.14	0.093

Caracterización de las películas a base de quitosano

Las películas nanocompuestas se caracterizaron mediante ensayos de tracción, ángulo de contacto, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y solubilidad (Marín-Silva y col., 2019).

Propiedades físicas de las películas

La solubilidad de las matrices fue determinada de acuerdo al método descripto por Lamarra (2019). Las muestras se cortaron con un tamaño de 2x2 cm, se pesaron, etiquetaron y colocaron en vasos de precipitado conteniendo 80 mL de agua milli-Q. El ensayo se realizó bajo agitación constante en un agitador orbital con control de temperatura a 20°C durante 1 hora. Las películas se extrajeron del agua milli-Q, se secaron superficialmente con papel tisú y se colocaron en estufa a 105±1°C hasta alcanzar un peso constante. Los valores informados corresponden al promedio de tres ensayos para cada muestra.

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua (WVP), se utilizó una celda de permeabilidad casera a 20° C y los ensayos se realizaron siguiendo un método ASTM modificado E96 (ASTM E96 / E96M-12, 2012). Una vez que se alcanzó la condición de estado estable, las celdas de permeación se pesaron durante 9 h. Cada valor informado corresponde al menos a cuatro determinaciones.

El ángulo de contacto se midió a temperatura ambiente utilizando un goniómetro Ramé-Hart Modelo 500 (Ramé-Hart Instrument Co., EE. UU.). Se colocó una gota de agua Milli-Q sobre la superficie de la película QAg_x y se registró la evolución de la forma de la gota con una cámara de video. Se utilizó el software de análisis de imágenes (DROPimage Advanced v2.2) para determinar el ángulo de contacto. Se llevaron a cabo un mínimo de diez mediciones, tomadas en diferentes posiciones de la película.

Propiedades mecánicas

La evaluación de las propiedades mecánicas para la caracterización de materiales se hace fundamentalmente utilizando ensayos destructivos. El porcentaje de elongación a la ruptura y el esfuerzo fueron determinados a una temperatura de 20˚C mediante ensayos de tracción con un Texturómetro TA.XT2i—Stable Micro Systems (England) provisto de un sistema de pinzas de tensión A/TG según la norma ASTM D638-01 (2001) sobre un mínimo de veinte probetas de 60 mm de longitud y 70 mm de ancho para cada formulación.

Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación a la ruptura (mm) se registraron mediante el software Texture Expert Exceed. A partir de estos parámetros se calculó la resistencia a la tracción o el esfuerzo (MPa). También se analizó el porcentaje de elongación definido como la variación de la longitud de las probetas con respecto a la longitud inicial.

Estudios térmicos y estructurales

El análisis morfológico de las películas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando el microscopio FEI modelo Quanta 200 (Holanda). Las muestras se examinaron a un voltaje de aceleración de 15 kV. La capacidad antimicrobiana de las matrices se cuantificaron según Lamarra (2019). Las películas QAg_X se sumergieron en nitrógeno líquido para su fractura y se montaron sobre tacos de bronce a través de una cinta adhesiva de carbono.

La estructura de las películas a base de quitosano también se evaluó mediante difracción de rayos X en un modelo analítico Philips PW 3710, X'Pert Pro P Analytical ModelPW3040 / 60 (Almelo, Países Bajos). La radiación de CuK (1.542 Å) operada a temperatura ambiente se generó a 30 mA y 40 kV, registrando la intensidad relativa en el rango de dispersión de (2θ) 3–60º con un tamaño de paso de 2θ 0.02º

El análisis térmico de las películas QAg_X se realizó utilizando un DSC Q100 (TA Instruments, New Castle, Delaware, EE.UU.) controlado y equipado con un módulo TA 5000. Las muestras se escanearon a una velocidad de calentamiento de 10°C min^{-1} usando MDSC entre -50°C y 250°C. Las señales tales como el flujo de calor total, los componentes reversibles y no reversibles se evaluaron a partir de los termogramas. Todos los resultados fueron el promedio de al menos dos repeticiones.

El análisis de las interacciones entre los componentes se realizó mediante técnicas ATR-FTIR. Los espectros se registraron mediante un espectrómetro Nicolet, iS10 Thermo Scientific (Madison, EE. UU.). Las películas se colocaron en el cristal de diamante ATR y los espectros se registraron mediante la acumulación de 32 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} en el rango de 4000–400 cm^{-1}. Los datos se analizaron utilizando el software Omnic 8 (Thermo Scientific, Madison, EE. UU.).

Capacidad antimicrobiana

La preparación de los inóculos y la capacidad antimicrobiana de las películas QAg_X se determinaron mediante el método de difusión en agar según Villarruel y col. (2015). Se inocularon

placas de Petri con agar Mueller-Hinton con 100 µL de suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* obteniendo una concentración de microorganismos del orden de 10^7-10^8 UFC ml^{-1}. Se utilizaron discos de películas QAg_X (1.5 cm de diámetro) para estimar las zonas de inhibición después de 24 y 48 horas de contacto con el medio utilizando un software de análisis de imágenes específico (Image J, NIH, EE UU).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software InfoStat (versión 2008) (InfoStat Group, Argentina). Se aplicaron análisis de varianza (ANOVA), regresiones lineales y prueba de comparación de medias Fisher LSD y el nivel de significancia utilizado fue 0.05. El análisis multivariado se realizó en los espectros ATR-FTIR, utilizando el programa de software The Unscrambler® (versión 8, CAMO Technologies, Woodbridge, Nueva Jersey).

3. Resultados y Discusión

Obtención de los nanocompuestos

Una vez sintetizadas las NpAg, las suspensiones se mezclaron con la solución de quitosano en distintas proporciones como se puede observar en la Tabla 1. Luego de formuladas las suspensiones filmogénicas, las mismas se extendieron en moldes y se secaron en estufa a 37°C hasta alcanzar peso constante. Las películas nanocompuestas con distintas proporciones de nanopartículas se denominaron QAg_x, donde x=1, 2, 3, 4.

Caracterización de las NpAg

Espectroscopía UV-Vis

La formación de NpAg a partir de $AgNO_3$ fue confirmada por análisis espectral UV-visible. Las NpAg tienen electrones libres, que dan lugar a las bandas de absorción de resonancia del plasmón superficial (SPR) (Noginov y col., 2007). La Figura 1 muestra el espectro UV-Vis de la suspensión coloidal de nanopartículas de plata en la solución de quitosano. El progreso de la reacción fue monitoreado por espectroscopía UV-visible (Figura 2). El pico de resonancia del plasmón superficial se observó a 430 nm acompañado por el cambio de color de la suspensión de amarillo a marrón amarillento. De acuerdo con Gahlawat y Choudhury. (2019) y Rezazadeh y col. (2020) la ausencia de picos en la región 470-700 nm indica la falta de aglomeración de las NpAg y por ende su estabilidad.

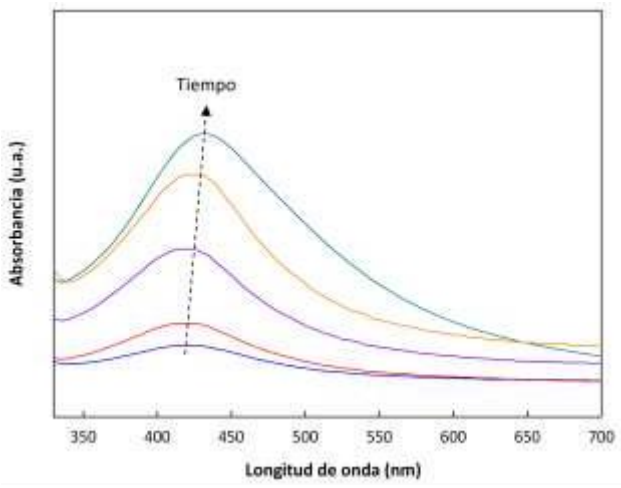


Figura 1. Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de plata en una solución de quitosano en función del tiempo de calentamiento a 95°C.

Análisis por microscopía TEM y SEM

El tamaño de las NpAg se analizó mediante el programa Image J sobre micrografías obtenidas por microscopía TEM (Figura 2). En la Figura 2a se observa la presencia de nanopartículas en la suspensión de quitosano y en la Figura b las NpAg después de un proceso de separación por filtración. La distribución del tamaño de las partículas mostrada en el histograma (Figura 2b) exhibió valores en el rango 2-20 nm con un tamaño medio de 13 nm, soportando los resultados obtenidos por UV-Vis (Figuras 2 y 3).

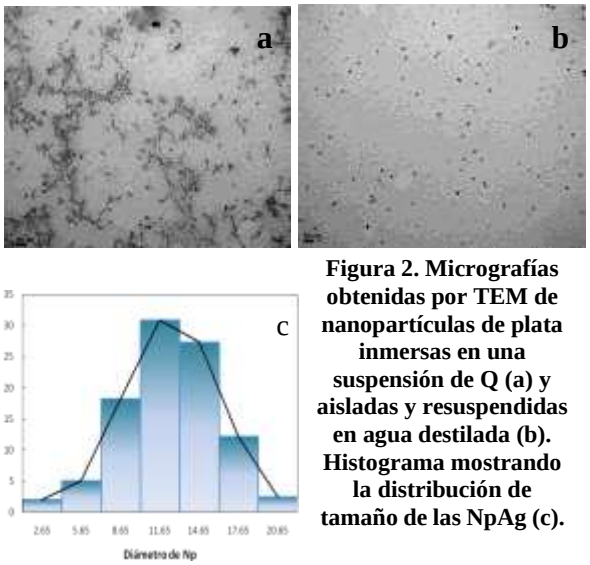


Figura 2. Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de plata inmersas en una suspensión de Q (a) y aisladas y resuspendidas en agua destilada (b). Histograma mostrando la distribución de tamaño de las NpAg (c).

El SEM fue empleado para visualizar las formas de las NpAg. La mayoría de las nanopartículas formadas fueron cúbicas. La Figura 2d muestra el espectro EDS de NpAg sintetizados a 95°C. Las nanopartículas metálicas de Ag mostraron el pico de absorción típico aproximadamente a 3 keV y algunas señales débiles en el espectro se debieron a los átomos de moléculas unidas a la superficie de las nanopartículas.

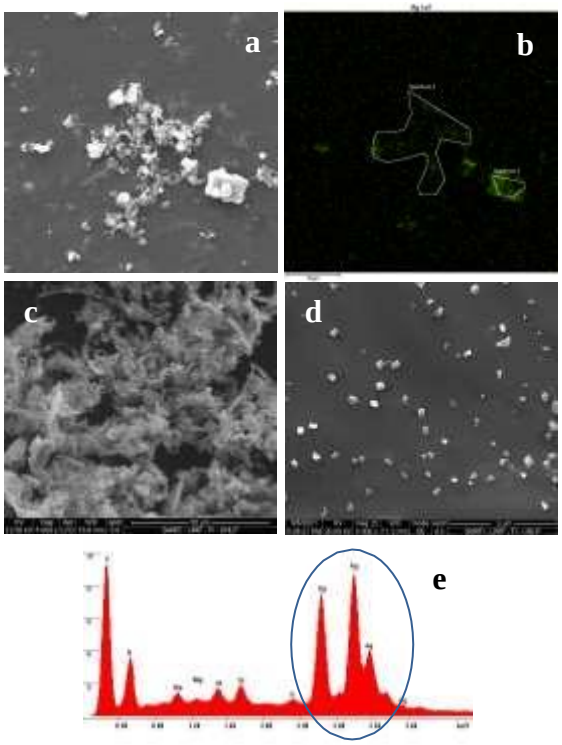


Figura 3. (a) Micrografías obtenidas por SEM de nanopartículas de plata, (b) mapa del análisis elemental de la superficie por EDS mostrando la distribución de NpAg, (c) suspensión de nanopartículas de plata en la matriz de quitosano, (d) suspensión filtrada de NpAg, (e) espectro EDS exhibiendo el pico de Ag correspondiente al área marcada en (b).

Patrón de difracción de RX

Los resultados obtenidos por DRX confirmaron la formación de NpAg con los picos distintivos ubicados a valores 2θ 38.2°, 44.4°, 64.6°, 77.5° y 81.7° correspondientes a los planos (111), (200), (220), (311) y (222), respectivamente (Figura 4) (Basavegowda y Lee, 2013). Los datos fueron confirmados utilizando datos estándar de difracción de polvo de la Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS no. 04-0783) (Tabla 2). Los picos correspondieron a una simetría cúbica centrada en las caras (fcc) (Jeong y col., 2010).

El pico intenso a 38° indicó un alto grado de cristalinidad (Sangsuk, 2010; Suriati y col., 2014). Picos característicos similares han sido reportados por otros investigadores (Suriati y col., 2014). Sin embargo, también se puede observar que los picos son relativamente anchos, indicando que el material está compuesto de cristalitos de plata muy pequeños (Suriati y col., 2014).

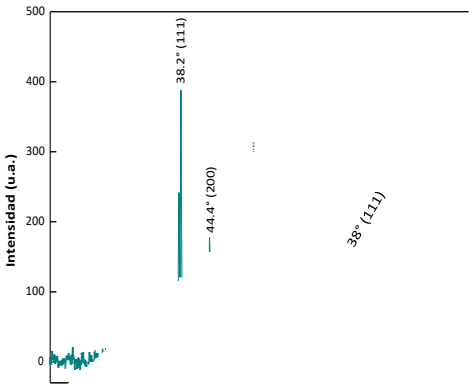


Figura 4. Patrón de difracción de RX de nanopartículas de plata obtenidas in situ usando una solución de quitosano 1% como agente reductor.

Tabla 2. Ángulo de difracción 2θ y espaciado interplanar teórico y experimental de nanopartículas de plata para los índices de Miller (h k l)

h k l	d_{hkl} (Å)	$2\theta_{hkl}$ (°)	d_{exp} (Å)	$2\theta_{exp}$ (°)
1 1 1	2.359	38.10	2.359	38.314
2 0 0	2.046	44.28	2.043	44.27
2 2 0	1.444	64.42	1.444	64.51
3 1 1	1.232	77.37	1.233	77.37

Caracterización de los nanocompuestos QAg

Propiedades de resistencia al agua

Para la determinación del porcentaje de solubilidad (S), muestras de la película de Q y las matrices nanocompuestas QAg_X se sumergieron en agua de calidad milli-Q bajo agitación controlada. La película control mostró un alto % de solubilidad (52.2%). Además hubo un significativo hinchamiento de la matriz, pero manteniendo las características estructurales del material; en comparación las matrices QAg_X (QAg_1, QAg_2, QAg_3 y QAg_4) presentaron bajas solubilidades y estructuralmente no hubo cambios. Si se compara con la S del control hubo una disminución en las matrices compuestas del 97.3% en promedio a 25° C después de 1 h de inmersión. Por lo tanto, la solubilidad de la matriz se puede adaptar controlando la concentración de las NpAg, permitiendo una amplia gama de posibles aplicaciones.

Tabla 3. Solubilidad (S) y ángulo de contacto AC de las nanomatrices QAgx

Muestras	S (%)	AC (°)	Imagen
Q	52.2 ±3.1[b]	72.8±1.3[a]	
QAg_1	2.7 ±1.5[a]	76.4±4.5[b]	
QAg_2	1.5 ±1.3[a]	80.4±4.8[c]	
QAg_3	1.2 ±0.9[a]	93.5 ±2.6[d]	
QAg_4	0.3 ±0.3[a]	94.2±1.4[d]	

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La Figura 4 muestra la variación de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las matrices Q con agregado de NpAg y de la película control. La presencia de nanopartículas ejerció un efecto significativo sobre las propiedades de WVP solo en el caso de la concentración más baja, QAg1 ($p<0.05$).

Con respecto a los resultados de WVP obtenidos para las otras formulaciones, se pudo observar que no presentaron diferencias significativas con respecto al control ($p>0.05$). Esto se debió posiblemente a que con el aumento de la concentración de nanopartículas se generó la aglomeración en zonas puntuales de la matriz durante la etapa de secado y este fenómeno posibilitó la movilidad de las moléculas de agua en forma más directa (menor tortuosidad).

La mejora de las propiedades físicas y mecánicas de las películas de nanocompuestos a base de Q se debió principalmente al efecto de relleno de las nanopartículas y las fuertes interacciones entre los componentes de QAg.

Según lo reportado por Salari y col. (2018) la incorporación de NpAg reforzó significativamente la matriz de Q y mejoró las propiedades de resistencia al agua como solubilidad, humedad e hinchamiento, además de la WVP de las películas con la menor proporción de NpAg. De acuerdo a Thomas y col. (2009), la menor absorción de agua de las películas nanocompuestas podría atribuirse al hecho de que la unión de nanopartículas de plata con los átomos de O ricos en electrones y átomos de N de las aminas presentes en las cadenas de quitosano produce enlaces cruzados adicionales dentro de la matriz de la película.

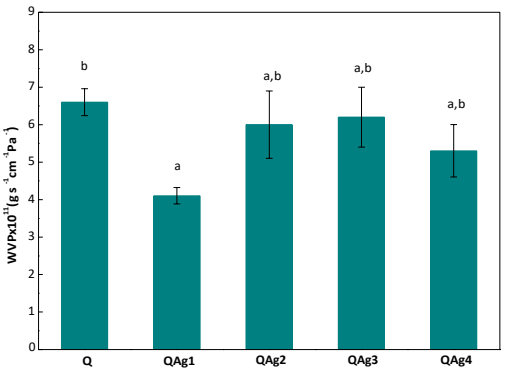


Figura 4. Permeabilidad al vapor de agua de matrices nanocompuestas a base de Q en función al agregado de suspensiones de NpAg.

Determinación del ángulo de contacto

Para determinar la hidrofobicidad de las matrices de nanocompuestas con suspensiones de Ag, se midió el ángulo de contacto del agua con la superficie de la película (*Tabla 3*). La película control presentó mayor hidrofilia en comparación con las matrices nanocompuestas QAg, con un ángulo de contacto de 72.8˚ debido a los grupos hidroxilo del quitosano.

Como se puede observar en la Tabla 3, después de la incorporación de NpAg a la matriz de Q, el ángulo de contacto aumentó significativamente ($p<0.05$). Esto podría ser atribuido a la hidrofobicidad de las NpAg que llevaron a un aumento de las propiedades hidrofóbicas superficiales de las matrices de QAg (Kanmani y Rhim, 2014).

Por otro lado Salari y col. (2018) compararon el AC entre matrices de Q con nanoparticulas de NpAg y de celulosa. La adición de Np generó el aumentó el AC de las matrices con el agua. Esto podría deberse a la reducción de los grupos hidrofílicos libres y al aumento de la cohesión en la superficie como resultado de la interacción de las cadenas de Q con las nanopartículas (Ojagh y col., 2010; Salari y col., 2018).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías del corte transversal de la película de quitosano revelaron la distribución uniforme de las nanopartículas de plata (Figura 5) ya que el quitosano nucleó y estabilizó las NpAg formadas y, por lo tanto, evitó su agregación (Thomas y col., 2009).

El análisis de la composición elemental del nanocompuesto por EDS indicó claramente la presencia de Ag (Figura 5, c y d). Además, se detectaron los elementos C, O y Au debido al recubrimieno.

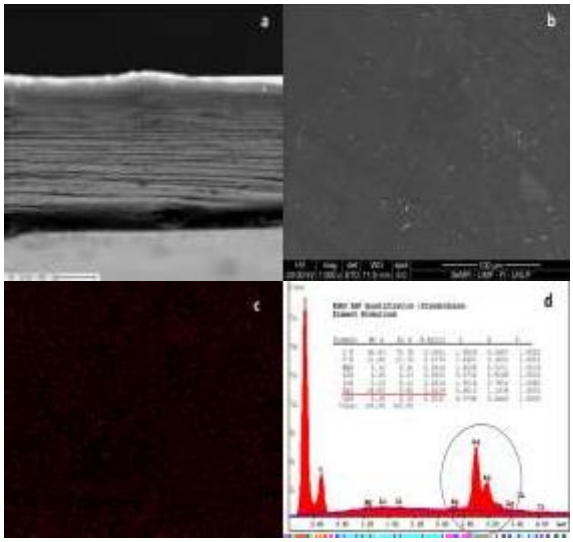


Figura 5. Micrografías obtenidas por SEM de nanocompuestos a base de quitosano funcionalizados con nanopartículas de Ag (a) corte transversal, (b) superficie. Los mapas de Ag fueron obtenidos mediante una microsonda de análisis elemental (c) y (d).

Propiedades mecánicas

Las matrices nanocompuestas QAg con bajas concentraciones de NpAg no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en los valores de esfuerzos con respecto a la película Q.

Con el incremento de la concentración de NpAg el esfuerzo aumentó y las diferencias fueron significativas ($p<0.05$) en relación a Q. Sin embargo no hubo diferencias entre ellas ($p>0.05$).

Con respecto a la elongación %, los nanocompuestos con las mayores concentraciones de NpAg no fueron diferentes entre sí ($p>0.05$). Las nanopartículas de plata formadas *in situ* en la matriz Q actuaron como refuerzo aumentando la resistencia de las películas y disminuyendo la elongación de las mismas.

Tabla 4. Valores de esfuerzo (MPa) y elongación % para las matrices nanocompuestas a base de quitosano funcionalizadas con NpAg.

Formulación	Esfuerzo (MPa)	Elongación %
Q	51.7 (7.0)[a]	5.3 (2.1)[a]
QAg$_1$	60.3 (7.4)[a,b]	7.9 (1.3)[a]
QAg$_2$	75.8 (8.5)[a,b]	6.1 (1.3)[a]
QAg$_3$	82.2 (4.5)[b]	3.9 (0.8)[a]
QAg$_4$	78.6 (5.1)[b]	4.3 (2.2)[a]

Análisis térmico

Los termogramas de DSC del quitosano y de los nanocompuestos exhibieron un pico endotérmico relacionado con la pérdida de agua (Figura 6a).

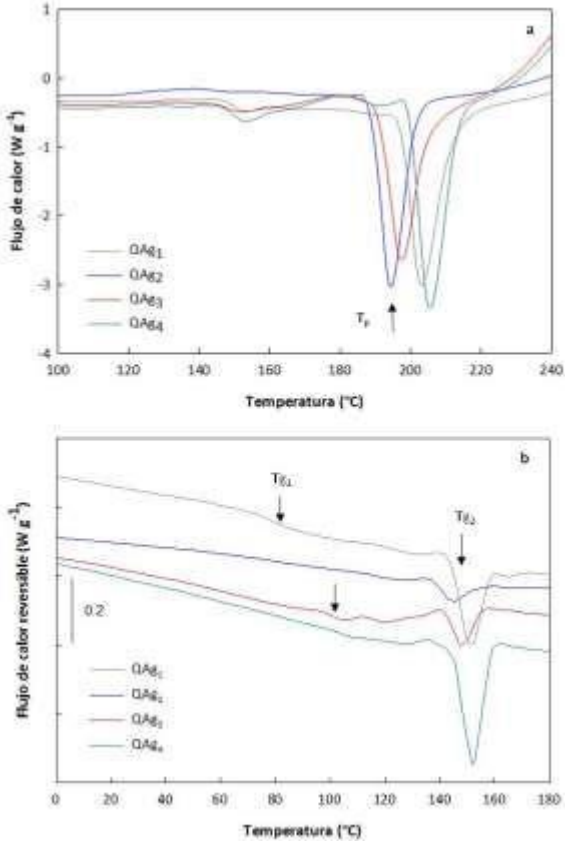


Figura 6. Análisis térmico de las películas Q y los nanocompuestos con distintas concentraciones de NpAg realizado a partir de las curvas de flujo de calor obtenidas por DSC y MDSC

La presencia de nanopartículas no cambió significativamente la posición de la temperatura de pico ($p>0.05$). Asimismo, se analizaron las curvas de calor reversible obtenidas por MDSC y se determinaron las temperaturas de transición vítrea (T_g) como puede observarse en la Figura 6b y en la

Tabla 5. La segunda T_g de los nanocompuestos se visualizó en todos los casos a temperaturas por encima de los 150°C. La posición de la primera T_g en algunos casos no resultó visible pero fue cercana a 77°C para QAg_1 y a 100°C para QAg_3 (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis térmico de las películas Q y los nanocompuestos con distintas concentraciones de NpAg realizado a partir de las curvas de flujo de calor obtenidas por DSC y MDSC

Formulación	T_p (°C)	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)
Q	122.4 (3.6)	91.4 (1.8)	-
QAg_1	203.5 (2.5)	77.5 (3.1)	147.7 (2.2)
QAg_2	194.3 (3.7)	-	141.2 (3.9)
QAg_3	197.4 (2.0)	100.9 (2.5)	145.8 (2.8)
QAg_4	205.3 (3.9)	-	148.1 (3.7)

Estos valores pudieron ser corroborados por la técnica de DMA. En la Figura 7 la T_g de la película Q se observó a 91°C. Mientras tanto, los nanocompuestos exhibieron dos T_gs correspondientes a la fase rica en quitosano a 100° y 89°C, y a la fase rica en nanopartículas a 182° y 215°C, para QAg_2 y QAg_4, respectivamente.

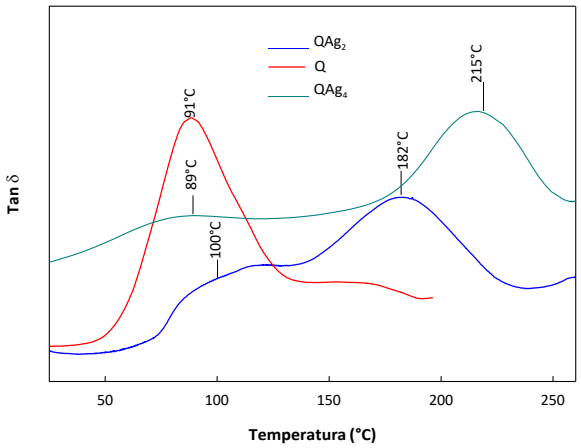


Figura 7. Análisis dinámico mecánico (DMA) de películas de quitosano y nanocompuestos QAg_2 y QAg_4 formulados con Q y NpAg.

El análisis térmico de los sistemas por TGA mostró que durante la etapa de calentamiento el quitosano exhibió una pérdida de peso en tres pasos (Figura 8 y Tabla 6), se confirmó que tanto el quitosano como los nanocompuestos poseen grupos polares y por lo tanto el agua puede ser fácilmente adsorbida en los sistemas por puentes de hidrógeno.

La primera pérdida se produjo en el rango de temperaturas 25-180°C correspondiente a la evaporación de la humedad. La segunda pérdida de 180-400°C fue causada por la descomposición del hidrocarburo. La pérdida en el rango 400-620°C se atribuyó a la descomposición del quitosano residual. Los nanocompuestos exhibieron un comportamiento similar. Sin embargo, los termogramas de los nanocompuestos tuvieron menor pérdida de peso a 620°C (Figura 8).

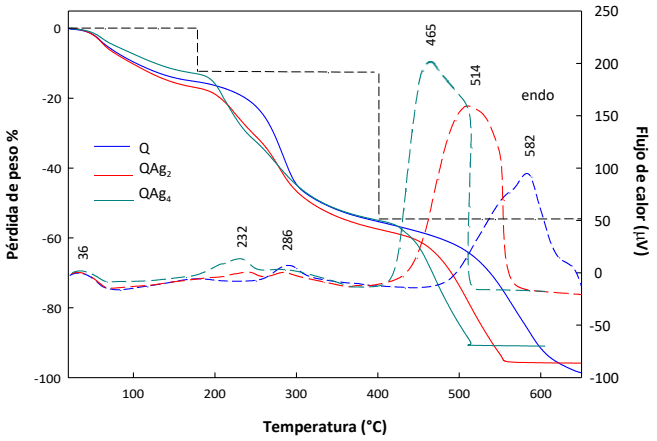


Figura 8. Termogramas obtenidos por TGA de muestras de Q y nanocompuestos formulados a base de Q funcionalizados con NpAg

Tabla 6. Pérdidas de peso de la película Q y los nanocompuestos QAg obtenidas por TGA para las diferentes etapas

	I etapa		II etapa		III etapa		Peso residual (%)
	T_{final} (°C)	Pérdida masa (%)	T_{final} (°C)	Pérdida masa (%)	T_{final} (°C)	Pérdida masa (%)	
Q	180	15.19	400	39.95	620	43.64	1.22
QAg_2	180	17.19	400	40.36	620	38.44	4.01
QAg_4	180	12.96	400	41.81	620	36.37	8.86

La descomposición ocurrió a menor temperatura porque la plata actuaría como un catalizador para la reacción a la descomposición (Nootsuwan y col., 2018).

Al final del proceso, los nanocompuestos de plata demostraron una mayor estabilidad que las películas de quitosano ya que a 600°C, 4 y 8.8% de material no sufrió degradación. Eso significa que las matrices contenían 4-8.8% de NpAg (Tabla 6). Resultados similares fueron informados por Rana y col., 2010; Vimala y col., 2010).

Asimismo, los picos de la curva DTA indicaron las temperaturas de la velocidad máxima de las tres etapas degradación (Tabla 6). La primera temperatura indicó la pérdida de agua, la segunda llamada temperatura de combustión pasó de 286° en Q a 232°C en QAg y la tercera temperatura de

degradación denominada temperatura de carbonización de 582° en Q a 514° en QAg_2 y 465°C en QAg_4. Se demostró para el quitosano que la energía asociada con esta segunda etapa depende del grado de acetilación del polímero. La cantidad de energía evolucionada en este proceso aumenta cuando el grado de acetilación del quitosano disminuye (Cárdenas y col., 2002). Cabe señalar que en la tercera etapa los picos fueron más amplios y tuvieron mayor intensidad (Rana y col., 2010).

Análisis ATR-FTIR

La principal diferencia entre los espectros del quitosano puro y los naocompuestos con NpAg radicó en el cambio en las intensidades relativas de las bandas infrarrojas situadas a 1632 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} (región marcada en celeste). Un aumento en la intensidad de la última banda sugirió que la plata afectó a los grupos amino del quitosano, ya que estas bandas se originaron a partir de las vibraciones de deformación del grupo NH en las aminas primarias (Božanić y col., 2010 y Goudarzi y col., 2016).

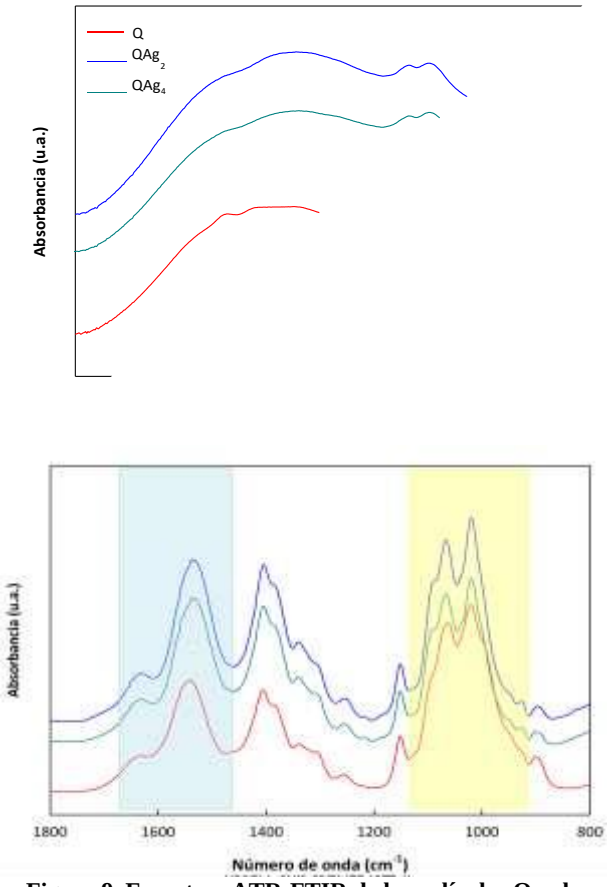


Figura 9. Espectros ATR-FTIR de las películas Q y de las matrices nanocompuestas QAg_2 y QAg_4 mostrando las regiones (a) 3600-2600 cm^{-1} y (b) 1800-800 cm^{-1}.

La presencia de un pico ubicado a 3350 cm^{-1} en la región 3600-3000 cm^{-1} (N-H y estiramiento O-H) en el espectro de Q se transformó en una región más achatada, signo de una mayor prevalencia del grupo O-H ya que el grupo N-H estuvo involucrado en la interacción con la plata (Nate y col., 2018).

Los grupos funcionales O-H y N-H tuvieron fuerte afinidad hacia los iones plata (región marcada en amarillo pastel). La diferencia en electronegatividad entre los átomos de O y N juega un papel importante ya que establece el sitio de deprotonación que puede favorecer la unión de electrones libres al metal (Figura 9).

La metodología PCA de las regiones espectrales 1200-800 cm^{-1} y 3700-2700 cm^{-1} permitió analizar las diferencias entre las muestras con distintas concentraciones de NpAg.

Las muestras se separaron en *clusters* o grupos en los que la variabilidad fue prácticamente explicada por PC1 en más del 90% mientras PC2 representó entre el 2 y el 7% para la primera y segunda ventana espectral, respectivamente (Figura 10).

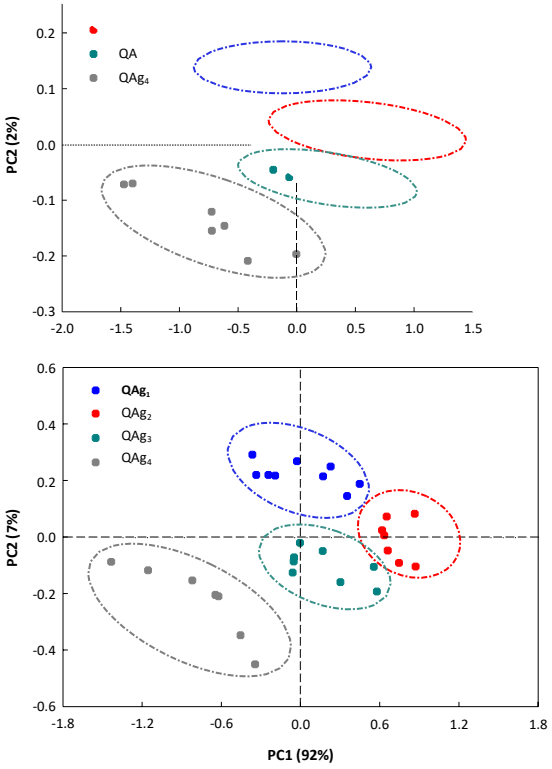


Figura 10. Gráfico biplot de las muestras QAg_x con distintas concentraciones de NpAg. Análisis PCA de las regiones espectrales (a) 1200-800 cm^{-1} y (b) 3700-2700 cm^{-1}.

Actividad antimicrobiana

Los ensayos de capacidad antimicrobiana frente al desarrollo de *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* (Figura 11) revelaron que después de la inclusión de NpAg en matrices de Q, los materiales incrementaron su

capacidad antimicrobiana a pesar de que los sistemas se tornaron más hidrofóbicos a medida que aumentó la concentración de nanopartículas.

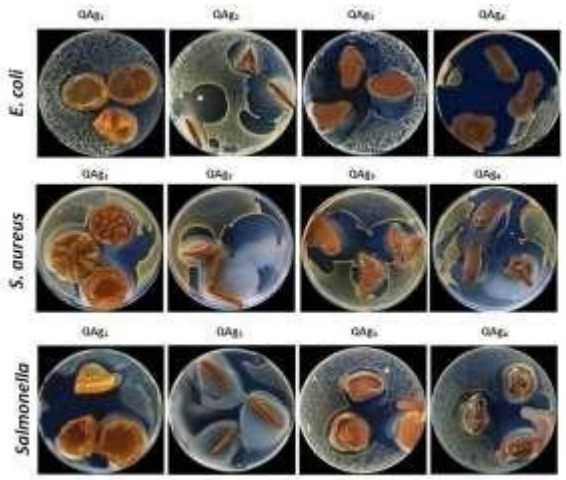


Figura 11. Fotografías de placas de Petri mostrando la inhibición del crecimiento de E. coli, S. aureus y Salmonella. Halos de inhibición generados por los discos de las matrices nanocompuestas QAg_1, QAg_2, QAg_3 y QAg_4.

4. Conclusiones

Las interacciones establecidas entre el quitosano y las nanopartículas explicarían los cambios evidenciados en la solubilidad de las matrices. La inclusión de nanopartículas de plata en matrices biopoliméricos permitió obtener materiales más hidrofóbicos y con mayor resistencia. Asimismo el efecto bactericida sobre *Salmonella*, *S. aureus* y E. *coli* arrojó resultados promisorios para su implementación como materiales antimicrobianos.

5. Referencias

Ahamed, M., Alsalhi, M. S., & Siddiqui, M. K. J. (2010). Clinica Chimica Acta Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, *411*(23–24), 1841– 1848. https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.016

Alavi, M., & Rai, M. (2019). Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginic acid biopolymers for antibacterial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103(21-22)*, 8669-8676. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10126-4

Alves, T., Souza, J. De, Rodrigues, L., Souza, R., & Pereira, L. (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety Silver nanoparticles : An integrated view of green synthesis methods , transformation in the environment , and toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *171*(December 2018), 691–700. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.095

ASTM E96 / E96M-12. (2012). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. In *ASTM*

International. https://doi.org/10.1520/E0096_E0096M-12

Basavegowda, N., & Rok Lee, Y. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using Satsuma mandarin (Citrus unshiu) peel extract: A novel approach towards waste utilization. *Materials Letters*, *109*, 31–33. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.07.039

Boanić, D. K., Trandafilović, L. V., Luyt, A. S., & Djoković, V. (2010). "Green" synthesis and optical properties of silver-chitosan complexes and nanocomposites. *Reactive and Functional Polymers*, *70*(11), 869–873. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.08.001

Cárdenas, G., Paredes, J. C., Cabrera, G., & Casals, P. (2002). Synthesis and characterization of chitosan alkyl carbamates. *Journal of Applied Polymer Science*, *86*(11), 2742–2747. https://doi.org/10.1002/app.11252

Dhote, V. K., Dhote, K., Pandey, S. P., Shukla, T., Maheshwari, R., Mishra, D. K., & Tekade, R. K. (2018). Fundamentals of polymers science applied in pharmaceutical product development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00003-0

Faried, M., & Shameli, K. (2016). Synthesis of silver nanoparticles via green method using ultrasound irradiation in seaweed Kappaphycus alvarezii media. *Research on Chemical Intermediates*, *42(12)*(May 2016), 7991–8004. https://doi.org/10.1007/s11164-016-2574-z

Gahlawat, G., & Choudhury, A. R. (2019). A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Advances*, *9*(23), 12944–12967. https://doi.org/10.1039/c8ra10483b

Goudarzi, M., Mir, N., Mousavi-Kamazani, M., Bagheri, S., & Salavati-Niasari, M. (2016). Biosynthesis andcharacterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. *Scientific Reports*, *6*(February), 1–13. https://doi.org/10.1038/srep32539

Hu, S., Cai, X., Qu, X., Yu, B., Yan, C., Yang, J., Li, F.,
Zheng, Y., & Shi, X. (2019). Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, *123*, 1320–1330. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.122

Hussain, J. I., Kumar, S., Hashmi, A. A., & Khan, Z. (2011). Silver nanoparticles: Preparation, characterization, and kinetics. *Advanced Materials Letters*, *2*(3), 188–194. https://doi.org/10.5185/amlett.2011.1206

Jeong, S. H., Kim, J. H., Yi, S. M., Lee, J. P., Kim, J. H., Sohn, K. H., Park, K. L., Kim, M. K., & Son, S. W. (2010). Assessment of penetration of quantum dots through in vitro and in vivo human skin using the human skin equivalent model and the tape stripping method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *394*(3), 612–615. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.032

Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, *148*, 162–169. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.047

Lamarra, J. (2019). *Matrices biodegradables como soportes de micro y nanopartículas activas para su aplicación como sistemas de liberación controlada* [Universidad Nacional de la Plata]. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75093

Marín-Silva, D. A., Rivero, S., & Pinotti, A. (2019a). Chitosan-based nanocomposite matrices: Development and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *123*, 189–200. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.035

Marín-Silva, D. A., Rivero, S., & Pinotti, A. (2019b). Chitosan-based nanocomposite matrices: Development and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *123*, 189–200. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.035

Muñoz-Bonilla, A., Echeverria, C., Sonseca, Á., Arrieta, M. P., & Fernández-García, M. (2019). Bio-based polymers with antimicrobial properties towards sustainable development. *Materials*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/ma12040641

Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Silver Nanoparticles : Synthesis and Therapeutic Applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *3*(4), 301–316. https://doi.org/10.1166/jbn.2007.041

Nate, Z., Moloto, M. J., Mubiayi, P. K., & Sibiya, P. N. (2018). Green synthesis of chitosan capped silver nanoparticles and their antimicrobial activity. *MRS Advances*, *3*(42–43), 2505–2517. https://doi.org/10.1557/adv.2018.368

Noginov, M. A., Zhu, G., Bahoura, M., Adegoke, J., Small, C., Ritzo, B. A., Drachev, V. P., & Shalaev, V. M. (2007). The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, *86*(3), 455–460. https://doi.org/10.1007/s00340-006-2401-0

Nootsuwan, N., Sukthavorn, K., Wattanathana, W., Jongrungruangchok, S., Veranitisagul, C., Koonsaeng, N., & Laobuthee, A. (2018). Development of antimicrobi al hybrid materials from polylactic acid and nano-silver coated chitosan. *Oriental Journal of Chemistry*, *34*(2), 683–692. https://doi.org/10.13005/ojc/340210

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, *122*(1), 161–166.https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033

Ramanathan, S., & Gopinath, S. C. B. (2017). Potentials in synthesizing nanostructured silver particles. *Microsystem Technologies*, *23*(10), 4345–4357. https://doi.org/10.1007/s00542-017-3382-0

Rana, V. K., Pandey, A. K., Singh, R. P., Kumar, B., Mishra, S., & Ha, C. S. (2010). Enhancement of thermal stability and phase relaxation behavior of chitosan dissolved in aqueous l-lactic acid: Using "silver nanoparticles" as nano filler. *Macromolecular Research*, *18*(8), 713–720. https://doi.org/10.1007/s13233-010-0801-9

Regiel, A., Irusta, S., Kyzioł, A., Arruebo, M., & Santamaria, J. (2013). Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against Staphylococcus aureus. *Nanotechnology*,

24(1). https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/1/015101

Rezazadeh, N. H., Buazar, F., & Matroodi, S. (2020). Synergistic effects of combinatorial chitosan and polyphenol biomolecules on enhanced antibacterial activity of biofunctionalaized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76726-7

Rolim, W. R., Pieretti, J. C., Renó, D. L. S., Lima, B. A., Nascimento, M. H. M., Ambrosio, F. N., Lombello, C. B., Brocchi, M., De Souza, A. C. S., & Seabra, A. B. (2019). Antimicrobial Activity and Cytotoxicity to Tumor Cells of Nitric Oxide Donor and Silver Nanoparticles Containing PVA/PEG Films for Topical Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*. https://doi.org/10.1021/acsami.8b19021

Salari, M., Sowti Khiabani, M., Rezaei Mokarram, R., Ghanbarzadeh, B., & Samadi Kafil, H. (2018). Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids,84*, 414–423. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.037

Sangsuk, S. (2010). Preparation of high surface area silver powder via Tollens process under sonication. *Materials Letters*, *64*(6), 775–777. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2010.01.013

Suriati, G., Mariatti, M., & Azizan, A. (2014). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method: Effect of reducing agent and surfactant concentration. *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering*, *10*, 1920. https://doi.org/10.15282/ijame.10.2014.9.0160

Tamayo, L., Palza, H., Bejarano, J., & Zapata, P. A. (2018). Polymer Composites With Metal Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications. Synthesis, Properties, and Applications. In *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814064-2.00008-1

Thomas, V., Yallapu, M. M., & Sreedhar, B. (2009). Journal of Biomaterials Science , Fabrication , Characterization of Chitosan / Nanosilver Film and Its Potential Antibacterial Application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *20*(14), 37–41. https://doi.org/10.1163/156856209X410102

Venkatesham, M., Ayodhya, D., Madhusudhan, A., Babu, N. V., & Veerabhadram, G. (2012). A novel green one- step synthesis of silver nanoparticles using chitosan : catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, *4(1)*(November 2012), 113–119. https://doi.org/10.1007/s13204-012-0180-y

Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering C*, *56*, 545–554. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.003

Vimala, K., Mohan, Y. M., Sivudu, K. S., Varaprasad, K., Ravindra, S., Reddy, N. N., Padma, Y., Sreedhar, B., & MohanaRaju, K. (2010). Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. *Colloids*

and Surfaces B: Biointerfaces, *76*(1), 248–258. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.044

Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, *20*(5), 595–601. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014

Wong, L. W., Hou, C. Y., Hsieh, C. C., Chang, C. K., Wu,
Y. S., & Hsieh, C. W. (2020). Preparation of antimicrobial active packaging film by capacitively coupled plasma treatment. *Lwt*, *117*(September 2019), 108612. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108612

Youssef, A. M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S. M., & Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *76*, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016